

DER GENETISCHE
KONTROLLMECHANISMUS
DES WIRTSBEREICHES
BEIM BAKTERIOPHAGEN MU

Rodica Sandulache

*Diss
München
1975*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DER GENETISCHE KONTROLLMECHANISMUS DES WIRTSBEREICHS
BEIM BAKTERIOPHAGEN MU

Dissertation

Fakultät für Chemie und Pharmazie

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von Rodica Sandulache

aus Bukarest, Rumänien

München 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 13 Juni 1985

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1981 bis Februar 1985 auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Dr. D. Kamp am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Ich danke Herrn Kamp für die Förderung meiner Arbeit und der Max-Planck-Gesellschaft für ein Promotionsstipendium.

Ich danke Herrn Professor W. Zillig für sein Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit.

Für viele nützliche Diskussionen danke ich meinen Kollegen Regine Kahmann, Beate Stern, Wolfgang Ritthaler, Robert Schmucker und Peter Prehm.

Für die Aufnahme der Massenspektren von methylierten Alditolacetaten danke ich Herrn W. Schaefer.

Für technische Hilfe bin ich Gaby Sowa, Marianne von Gruber und Renate Koch dankbar.

Meinem Mann und meinem Sohn

Es ist nicht genug zu wissen;
man muß auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen;
man muß auch tun.

Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	5
2. EINLEITUNG	7
2.1 Der Phage Mu	7
2.2 Das G-Segment	12
2.3 Sequenzspezifische Rekombinationsfunktionen	15
2.4 Evolution des Inversions-Systems	16
2.5 Adsorption der Phagen: ein spezifischer Prozeß	17
2.6 Problemstellung	18
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 MATERIAL	19
3.1.1 Besondere Chemikalien und Enzyme	19
3.1.2 Bakterienstämme und Bakteriophagen	20
3.2 METHODEN	21
3.2.1 Mikrobiologische Methoden	21
3.2.1.1 Medien und Puffer	21
3.2.1.2 Zucht von Bakterien	21
3.2.1.3 Herstellung von Phagenlysaten	22
3.2.1.4 Titerbestimmung von Phagenlysaten	22
3.2.1.5 Konstruktion von lysogenen Bakterienstämmen	22
3.2.1.6 Isolierung der phagenresistenten Mutanten	23
3.2.1.7 Messung der Plattierungseffizienz	23
3.2 Bereitung der Mu Antiseren	24
3.3 Messung der Inaktivierung der Phagen durch LPS	24
3.4 Phagenpräparation	25
3.5 DNA-Präparation	26
3.6 Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA	27

3.7 DNA-Analyse	28
3.7.1 Restriktionsanalyse	28
3.7.2 Gelelektrophorese	29
3.7.3 Sequenzierung	29
3.7.3.1 Dephosphorylierung	29
3.7.3.2 Endmarkierung	30
3.8 LPS-Analyse	33
3.8.1 Isolierung des Lipopolysaccharides	33
3.8.2 Pronase-Behandlung	33
3.8.3 Perjodatoxidation	33
3.8.4 KDO-Bestimmung	33
3.8.5 Isolierung des Oligosaccharides aus dem LPS	34
3.8.5.1 Phenol-Schwefelsäure-Test	34
3.8.5.2 Quantitative Analyse des Oligosaccharids	35
3.8.5.3 Abspaltung des Phosphats	36
3.8.5.4 Bestimmung der anomeren Konfiguration	36
3.8.5.5 Methylierung der Neutralzucker	37
3.9 Computer-Analyse	38
4. RESULTATE	39
4.1 UNTERSUCHUNG DER REZEPTORSTRUKTUR FÜR MU PHAGEN	39
4.1.1 Lipopolysaccharid als rezeptoraktive Substanz für die Mu-Phagen	39
4.1.2 Charakterisierung des Rezeptors von Mu G(+) Phagen ...	41
4.1.2.1 Inaktivierung durch LPS aus verschiedenen core-Typen	41
4.1.2.2 Inaktivierung durch LPS mit defektem "core" aus <i>E.coli</i> K12 Stämmen	43
4.1.2.3 Isolierung von Mu resistenten <i>E.coli</i> K12-Mutanten ..	45

4.1.2.4 Biochemische Charakterisierung der Mu-resistenten Mutanten	46
4.1.2.5 Phagentypisierung der Rezeptormutanten	49
4.1.2.6 Kohlenhydrate als Inhibitoren der Phagenadsorption ..	52
4.1.3 Charakterisierung des Rezeptors von Mu G(-)-Phagen ...	53
4.1.3.1 Untersuchung von LPS ^{aus} sensitiven Stämmen	53
4.1.3.2 Lipopolysaccharid von <i>Enterobacter cloacae</i>	54
4.1.3.3 Lipopolysaccharid von <i>Erwinia carotovora</i>	57
4.1.3.4 Hemmung der Adsorption durch Kohlenhydrate	61
4.1.4 Die Rezeptorstruktur der Mu G(-) hr-Mutante	63
4.1.5 Charakterisierung des Rezeptors von P1	65
4.1.5.1 Die Affinität des Phagen P1 G(-) für LPS	66
4.1.5.2 Charakterisierung des Rezeptors von P1 G(+)	68
4.1.6 Konstruktion des MuhP1-Hybrids und Charakterisierung seines Wirtsbereiches	71
4.2 UNTERSUCHUNG DER SCHWANZFASERN VON MU	73
4.2.1 Morphologie der Mu-Phagen	73
4.2.2 Antigene Eigenschaften von Mu G(+)- und Mu G(-)-Phagen	75
4.2.3 Untersuchung der Schwanzfasergene	80
4.2.3.1 Analyse der MuhP1 Hybride	80
4.2.3.2 Sequenzierung des Mu P1 Hybrides	85
4.2.3.3 Sequenzierung des Mu G(-)h Phagen	91
4.2.3.4 Charakterisierung der Mu pAp1 Phagenmutante	96
4.2.3.5 Sequenzierung der Mu pAp1 Phagen	98
5. DISKUSSION	104
5.1 Die Phagenrezeptoren	104
5.2 Schwanzfasern	106

5.2.1 Die Schwanzfasern der Mu- und P1-Phagen	106
5.2.1.1 Beschreibung der G-Segment-Gene	107
5.2.1.2 Die Beteiligung der Gene des G-Segments an der Schwanzfaserbiosynthese	110
5.2.1.3 Analyse der Schwanzfasern auf Proteinebene	113
5.2.1.4 Die LPS-Bindungsstelle	117
5.2.1.5 Evolution der Schwanzfasern bei den Phagen Mu, P1, P7 und D108	119
5.3 Andere Beispiele von DNA-Umordnungen	121
6. LITERATUR	123
7. Abkürzungen	133

ZUSAMMENFASSUNG

Der Bakteriophage Mu enthält in seinem Genom ein bewegliches Element, das G-Segment, das durch eine spezielle phageneigene Rekombinationsfunktion, *gin*, invertiert wird. Die biologische Bedeutung der G-Inversion wurde durch ihren Einfluß auf die Infektiosität erkannt. Abhängig von der G-Orientierung infizieren *gin*-defekte Phagen, deren G-Segment in jeweils einer Orientierung G(+) oder G(-) fixiert ist, verschiedene Stämme. Mu G(+) Phagen wachsen auf *E.coli* K12 und *Salmonella* Stämmen, und Mu G(-) auf *Enterobacter cloacae*, *Erwinia carotovora*, *Citrobacter freundii* und *Serratia marcescens*.

In den vorliegenden Untersuchungen sollten die Zellwandstrukturen, die von infektiösen Phagen spezifisch erkannt werden, aufgeklärt und die für die Kontrolle der Wirtsspezifität verantwortlichen Gene von Mu analysiert werden.

Mu-Phagen adsorbieren an ihren Wirtsstamm über spezifische Rezeptoren, die auf dem Lipopolysaccharid (LPS), einer Komponente der äußeren Zellwand, liegen (Kamp & Sandulache, 1983). Durch phagenresistente Mutanten konnte gezeigt werden, daß Mu G(+) die Struktur Glc α 1-2Glc (Sandulache, Prehm & Kamp, 1984) und Mu G(-) die Struktur Glc β 1-6Glc (Sandulache & Prehm 1985; Sandulache, Prehm, Toussaint & Kamp, eingereicht) in den distalen Bereichen des LPS erkennt.

Die Phagen P1, P7 und D108, die ein zu Mu homologes G-Segment besitzen, binden an einen endständigen 1,2- oder 1,3-gebundenen Glucoserest und haben deswegen einen erweiterten Wirtsbereich (Sandulache, Ritthaler & Kamp, eingereicht).

MuP1 Hybride, die durch Kreuzung im G-Segment hergestellt wurden, und die Phagenmutanten Mu pAp und Mu G(-)h 101 zeigen ebenfalls einen veränderten Wirtsbereich. Im G Segment kartieren vier Gene (S und U, bzw. S' und U'), von denen je zwei in einer der beiden Orientierungen des G-Segments exprimiert werden. Um festzustellen, welche von ihnen an der Schwanzfaser-Biosynthese beteiligt sind, wurden Phagen-Hybride und -Mutanten analysiert.

Die crossover-Stelle des P1 G-Segments in Mu befindet sich im C-terminalen Teil des S Gens. Auch die Punktmutationen in Mu pAp bzw. Mu G(-)h liegen in dem selben Bereich des S-, bzw. S'-Gens. Durch diese Ergebnisse konnte die LPS-Bindungsstelle im Bereich der letzten 80 Aminosäuren des S- bzw. S'-Proteins lokalisiert werden (Sandulache, Kahmann & Kamp in Vorbereitung).

Anti G(+) und Anti G(-) Seren konnten spezifisch die homologen Phagen neutralisieren, aber auch mit P1- und D108-Phagen kreuzreagieren.

2. EINLEITUNG

Barbara McClintock hat Ende der 40er Jahre zum ersten Mal beim Mais bewegliche DNA-Sequenzen, "controlling elements" beobachtet, die die Expression bestimmter Gene beeinflussen und dadurch die Pigmentierung der Maiskörner bewirken. (McClintock, B., 1950, 1956) Inzwischen sind verschiedene Typen solcher Elemente nachgewiesen und untersucht worden, sowohl bei Eukaryonten als auch bei Prokaryonten. Ein komplexes Beispiel für bewegliche Elemente bei Prokaryonten ist der Bakteriophage Mu.

2.1 Der Phage Mu

Die mutagene Wirkung des temperenten Phagen Mu auf das Wirtsgenom hat zu seiner Entdeckung geführt (Taylor, 1963).

Nach dem Eindringen in einen sensitiven Wirt durchläuft der Phage Mu entweder einen lytischen oder einen lysogenen Zyklus.

Im lytischen Zustand repliziert die Virus-DNA und wird in die neu synthetisierten Hüllproteine verpackt. Nachdem die Wand der Wirtszelle aufgelöst ist, werden ungefähr 100 Phagenpartikel ins Kulturmedium freigesetzt.

Bei der Lysogenisierung integriert das Phagengenom ins Wirtschromosom. Es kodiert für einen Repressor, der die meisten viralen Funktionen blockiert. Als Prophage vermehrt sich das Mu-Genom solange zusammen mit dem Wirtsgenom bis der Repressor spontan inaktiviert wird und der Phage dann in einen lytischen Zustand übergeht.

Im Gegensatz zu anderen temperenten Phagen ist der

Bakteriophage Mu ein bewegliches Element: im lytischen und im lysogenen Zyklus integriert er in verschiedene Bereiche des Wirtschromosoms. (Howe & Bade, 1975; Bukhari, 1976) Sowohl durch seine unspezifische Integration im lysogenen Zustand, als auch während seiner lytischen Replikation erzeugt Mu an den Insertionsstellen in der Wirts-DNA chromosomale Veränderungen und führt zu einer hohen Mutationsrate (Taylor, 1963). Bei der Replikation entstehen Cointegrate von Mu-Kopien, die über das gesamte Wirtsgenom verteilt sind (Toussaint & Faelen, 1973; Toussaint & Resibois, 1982). eine für Transposons (Tn) charakteristische Eigenschaft (Starlinger, 1984).

In "vivo" Studien mit Mini-Mu-Plasmiden zeigten, daß die Replikation von Mu und die Transposition ähnlichen Mechanismen folgen (Schumann & Bade, 1979; Schumm & Howe, 1980). Kurze invertierte Sequenzwiederholungen, "inverted repeats", vor den Enden des Mu-Genoms (Kamp & Kahmann 1981) entsprechen den terminalen invertierten Sequenzen bei Transposons und werden wie diese von einer spezifischen Transposase erkannt. Sie wird von den Genen A und B kodiert (Kamp & Kahmann, 1981; Mizuuchi, 1983; Craigie et al., 1984).

Verschiedene Okazaki-Fragmente, die nach Mu-Induktion isoliert wurden, hybridisieren ausschließlich mit dem r-Strang von Mu (Wijffelman & van de Putte, 1977). Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, daß die Mu-Replikation unidirektional vom c-Ende zum S-Ende läuft und darüberhinaus, intakte Enden und die Produkte von A und B benötigt

(Abb. 1).

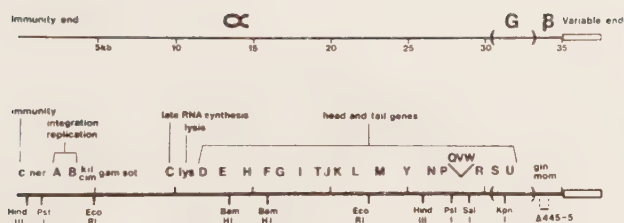


Abb. 1 Physikalische und genetische Karte des Mu G(+)- Bakteriophagen ($\Delta 445-5$ Deletion, die zu Phagen mit dem G-Segment in einer eingefrorenen Orientierung führt)(Howe, 1980).

Daß die Gene A und B sowohl für die Replikation, als auch für die Transposition benötigt werden, zeigt, daß beide Vorgänge untrennbar miteinander verknüpft sind.

Die Verpackung der Phagen-DNA beginnt am linken Ende des Genoms. Da der Phagenkopf mehr als die Länge eines Phagen-genoms aufnehmen kann, wird noch ein Teil der angrenzenden Wirts-DNA mitverpackt, die bei Denaturierung gefolgt von Renaturierung nicht komplementäre, einzelstrangige "split ends" (SE) bildet. (Abb. 2)

Elektronmikroskopische Heteroduplex-Untersuchungen der Mu-DNA die aus induzierten Lysogenen gereinigt und einem Denaturierungs-Renaturierungsvorgang unterworfen wurde, zeigten, daß bei 50% der Moleküle die doppelstrangige DNA von einzelstrangigen Bereichen unterbrochen ist. Die doppelstrangigen Regionen sind α (33Kb) und β (1,7Kb), die einzelsträngigen das G-Segment (3Kb) und die "split ends" deren Länge von Molekül zu Molekül variiert (ca. 1,7Kb) (Abb. 2) (Daniell et al., 1973). Das G-Segment zeigt sich als "bubble", was darauf schließen ließ, daß das G-Segment in unterschiedlichen Orientierungen vorliegt, die DNA in dieser Region bei der Renaturierung also nicht wieder paaren kann (Daniell et al., 1973, Hsu & Davidson, 1974).

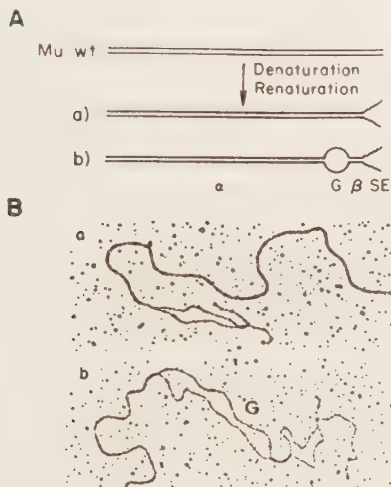


Abb. 2 Schematische Darstellung der Mu-DNA

Nach Denaturierung und Renaturierung:

a) In der einen Hälfte der Heteroduplex-Moleküle liegt das G-Segment als Duplex-DNA vor

b) in der anderen Hälfte als G "loop" (unten elektronische Aufnahmen) (Kamp et al., 1978).

2.2 Das G-Segment

Das G-Segment ist von 34 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen (IR) flankiert. Durch Rekombination dieser kurzen Sequenzen wird das G-Segment invertiert (Hsu & Davidson, 1974; Kamp et al., 1978; Howe, 1980). Diese Inversion wird durch die sogenannte *gin*-Funktion katalysiert, die die "inverted repeats" als Substrat erkennt und deren Gen direkt neben dem G-Segment kartiert (Chow et al., 1977; Kamp et al., 1978) (Abb. 2).

Das G-Segment des Mu-Phagen ist ein bewegliches genetisches Element, das durch Inversion die genetische Information gezielt verändert. Die biologische Bedeutung der G-Inversion in Mu wurde durch ihren Einfluß auf die Infektiosität erkannt. *Gin*-defekte Phagen, deren G-Segment in jeweils einer Orientierung fixiert ist - G(+) oder G(-) - können je nach Orientierung verschiedene Stämme infizieren (Kamp, 1981; van de Putte et al., 1980; Faelen et al., 1981). Mu G(+) Phagen wachsen auf *E.coli* K12, und *Salmonella arizonae*, Mu G(-) Phagen dagegen auf *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Erwinia carotovora*, *Citrobacter freundii*.

Durch "marker rescue", Komplementationsstudien und DNA-Sequenzierung wurden zwei Gruppen von Genen, S, U und S', U' in G-Segment identifiziert (Howe et al., 1979; Giphart-Gassler et al., 1982; Kahmann & Kamp in Vorbereitung). Diese Gene sind um einen Transkriptionsterminator angeordnet und von einem Promoter aus gelesen, der in der α -Region außerhalb des G-Segments liegt. Abhängig von der

jeweiligen G-Orientierung werden S und U (G(+)-Orientierung) bzw S' U' (G(-)-Orientierung) exprimiert (Abb. 3).

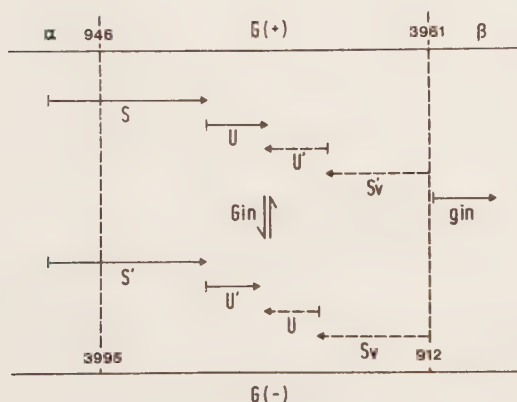


Abb. 3 Genetische Organisation des G-Segments

(nach Sequenzierungsdaten von R. Kahmann)

Die Zahlen entsprechen dem Ende bzw. Anfang des "inverted repeat". Die durchgezogenen Pfeile zeigen die Lage und die Richtung der Transkription der kodierenden Segmente für S, U, U' und S' Gene. Die unterbrochenen Pfeile geben nur die Lage der nicht transkribierten Segmente an.

S und S' bestehen aus einem gemeinsamen konstanten DNA-Abschnitt in der α -Region, der durch G-Inversion an einen variablen Teil im G-Segment gekoppelt wird.

Zum G-Segment von Mu homologe invertierbare Segmente wurden elektronenmikroskopisch auch in den Phagen P1, P7 und D108 gefunden. (Chow & Bukhari, 1976; Chow et al., 1978; Gill et al., 1981). Während der Phage D108 dem Phagen Mu sehr ähnlich ist, unterscheiden sich P1 und P7 genetisch deutlich von ihm. Ihre DNA hat ca. 3 x die Länge von Mu-DNA und integriert im lysogenen Zustand nicht ins Wirtschromosom. Ihre Prophagen verhalten sich wie Plasmide (Yun & Vapnek, 1977).

Die invertierbaren DNA-Segmente von P1 und P7 sind von deutlich größeren IRs begrenzt (640bp) als das G-Segment von Mu (34bp). In einem der IRs weist P7 im Unterschied zu P1 eine ca 300bp lange Deletion auf (Yarmolinsky, 1977). Die invertierbaren Segmente von P1 (Hiestand-Nauer & Iida, 1983; Iida, 1984) P7 und D108 haben offensichtlich dasselbe Genmuster wie das Mu G-Segment und werden - wie Komplementationsexperimente und DNA-Sequenzvergleiche zeigten - von *gin*-ähnlichen Funktionen invertiert (Chow et al., 1978; Kamp & Kahmann, 1981; Kamp et al., 1984). Die für Inversion kodierenden Gene kartieren an gleicher Stelle wie *gin*, beim Phagen P1 wird das *cin* Gen aber in entgegengesetzter Richtung transkribiert (Iida et al., 1982).

2.3 Sequenzspezifische Rekombinationsfunktionen

Die von *gin* bewirkte konservative sequenzspezifische Rekombination ist ähnlich der Integration und Excision des Phagen Lambda (Nash, 1981; Kamp et al., 1979). Dies wurde von Sequenzhomologien zwischen *gin* von Mu und der λ Integrase (*int*) untermauert (Kamp et al., 1984).

Andere sequenzspezifische Rekombinationssysteme wurden im bakteriellen Chromosom entdeckt. Das *pin*-Gen ist Teil eines cryptischen Prophagen; es bewirkt die Inversion des P-Segments. Obwohl das P-Segment keine Ähnlichkeit zu dem Mu-G-Segment zeigt, kann *pin* *gin* komplementieren und ist zu ihm partiell homolog. Der phänotypische Effekt der P-Inversion ist nicht bekannt (Plasterk et al., 1983; Plasterk & van de Putte, 1984).

Ein anderes Beispiel ist die von der *hin*-Funktion in *S.typhimurium* bewirkte "Phasenvariation" (Silverman & Simon, 1983). Wie *gin* schaltet das *hin*-Produkt Gen-Expression an und ab, das *hin* Gen liegt aber im Unterschied zu *gin* innerhalb des invertierbaren H-Segments. Dieses enthält auch den Promoter von dem aus die Flagellen Gene H1 und H2 abgelesen werden (Simon et al., 1980). Obwohl keine Ähnlichkeit zwischen dem H- und dem G-Segment festgestellt wurde, sind *gin* und *hin* gegenseitig komplementierbar (Kutsukake & Iino, 1980; Ritthaler, Kahmann & Kamp, eingereicht) und zeigen ca. 60% Sequenzhomologie (Kamp et al., 1984).

2.4 Evolution des Inversions-Systems

Die Inversions-Funktionen sind auf DNA- und Protein-Ebene homolog und mit einander komplementierbar (Kamp et al., 1979; Ritthaler, Kahmann & Kamp, eingerichtet). Sequenz-homologien wurden aber auch zwischen *gin*-Funktionen und einem mit diesen nicht komplementierbaren System, der Resolvase (*tnpR*) des Transposons Tn3 festgestellt (Simon et al., 1980). Das *tnpR*-Gen befindet sich, im Gegensatz zu *gin*, innerhalb des beweglichen Elements. Sein Produkt reguliert die Expression von *tnpA*-Transposase und steuert gleichzeitig die sequenzspezifische Auflösung der Cointegrate während der Transposition (Heffron, 1983).

Es wurde ein Modell für die *gin*-Evolution vorgeschlagen, in dem das *gin*-Gen von einem *tnpR*-ähnlichen Vorfahren divergiert ist, dessen Produkt im Verlauf der Evolution eine Inversions-Funktion übernommen hat (Kamp et al., 1984).

Die Sequenzhomologie und die funktionelle Ähnlichkeit zwischen *gin* und *tnpR* läßt die Annahme zu, daß das invertierbare G-Segment aus einem transposablen Element entstanden ist. Dafür spricht die Verbreitung des G-Segments in Organismen, völlig unterschiedlich zu Mu, nämlich in P1 und P7. Darüberhinaus wurde kürzlich ein G-Segment sogar im *E.coli* K12 Chromosom gefunden (Kamp, Kahmann & Stern im Druck). Die unterschiedlichen Strukturen der IRs, die die G Segmente von P1, P7 bzw. von Mu flankieren, könnten verschiedene Stadien in dem Entwicklungsprozeß des Inversionssystems darstellen.

2.5 Adsorption der Phagen: ein spezifischer Prozeß

Die Phageninfektion eines Bakteriums setzt die Erkennung spezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche voraus. An solche Strukturen binden die Phagen mit ihren Adsorptionsorganellen: "spikes" oder Schwanzfasern. Es gibt Phagen, die gram-positive Bakterien infizieren; sie erkennen bestimmte Strukturen in Peptidoglycan-Komplexen oder in Proteinen (Lindberg, 1973, 1977). Alle oben genannten Phagen infizieren gram-negative Bakterien und haben überlappende Wirtsbereiche (Hull et al., 1978; Toussaint et al., 1978). Plattierungsexperimente auf Stämmen mit defekten Zellwandstrukturen haben gezeigt, daß sich der Rezeptorbereich für P1-Phagen im Lipopolysaccharid (LPS) befindet (Ornellas & Stocker, 1974).

LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran der gram-negativen Bakterien. Bei glatten (S) Stämmen besteht es aus einem O-Polysaccharid, daß aus Wiederholungseinheiten aufgebaut und über ein core-Oligosaccharid an Lipid A gebunden ist (Galanos et al., 1977). Die Zusammensetzung und die Struktur des O-Polysaccharids bestimmt die individuelle serologische Spezifität der verschiedenen O-Serotypen gram-negativer Bakterien. Das Polysaccharid wird deshalb auch als O-Antigen bezeichnet. Durch Mutationen können Bakterien die Fähigkeit zur Bildung von O-spezifischen Antigenen verlieren und zu rauen (R) Mutanten werden. Das LPS einer R-Mutante besteht nur aus Lipid A und core-Oligosaccharid. Diese Struktur ist weniger variabel als die der O-spezifischen Polysaccharide. Bisher sind fünf serolog-

isch-unterscheidbare *Enterobacteriaceae* core-Typen bekannt.

2.6 Problemstellung

Der Bakteriophage Mu infiziert verschiedene Bakterien abhängig von der Orientierung seines G-Segments. Die Schlußfolgerung liegt nahe, daß Gene, die durch G-Inversion abwechselnd exprimiert werden, an der spezifischen Wechselwirkung mit unterschiedlichen Wirten beteiligt sein müssen.

Der erste Schwerpunkt meiner Arbeit ist, die Rezeptorstrukturen für den Phagen Mu mit unterschiedlich orientierten G-Segmenten zu charakterisieren. Den zweiten Teil meiner Arbeit bildete die Untersuchung der im G-Segment kartierten Gene. Im Vordergrund stand dabei die Aufklärung ihrer Rolle bei der Bestimmung des Wirtsbereiches.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Besondere Chemikalien und Enzyme

Agarose (Sigma, München)
 Agarose (Seakam, USA)
 Sephadex G50 (Pharmacia Fine Chemicals, Schweden)
 Sephadex LH20 (Pharmacia Fine Chemicals, Schweden)
 CsCl (Baker Chemikals, Deventer NL)
 Dithiothreitol (Merck, Darmstadt)
 Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg)
 Polyethylenglykol 6000 (Serva, Heidelberg)
 Harnstoff (Biorad, USA)
 Polyacrylamide (Biorad, USA)
 Hydrazin (Biorad, USA)
 Piperidin (Biorad, USA)
 Petroläther (Merck, Darmstadt)
 Pyridin (Merck, Darmstadt)
 Thiobarbitursäure (Merck, Darmstadt)
 Acetanhydrid (Merck, Darmstadt)
 Flußsäure (Merck, Darmstadt)
 Natriumborhydrid (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
 Dimethylsulfoxid (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
 Methyljodid (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
 Chromtrioxid (Merck-Schuchardt)

(γ - ^{32}P)-ATP (Amersham, Braunschweig)

Enzyme

Restriktionsenzyme:

Hind II, Kpn I, Hpa II, Hpa I, Bgl I, Cla I, Bal I
 (Boehringer, Mannheim oder BRL, Neu-Isenburg)

Pronase (Calbiochem, USA)
 DNase I (Sigma, München)
 RNase A (Sigma, München)
 alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim)
 Polynukleotidkinase (Boehringer, Mannheim)
 Terminale Deoxynukleotidyl Transferase (Amersham, Braunschweig)

3.1.2 Bakterienstämme und Bakteriophagen

Die Ausgangsstämme und Bakteriophagen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Stamm	relevante Eigenschaften	Herkunft
Bakterien		
<i>E. coli</i> CSH50	Ara ⁻ Lac ⁻ Pro ⁻ Str ⁻ B1 ⁻	Miller (1972)
<i>E. coli</i> K-12 C600	Indikator für Mu G(+)	Appleyard (1954)
<i>E. coli</i> K12 PL-2	galE	Prehm et al. (1976)
<i>E. coli</i> K12 Gal-23	galU	Prehm et al. (1976)
<i>E. coli</i> K12 H165	Hfr H	Hoffmann-Berling
<i>E. coli</i> K12 S1652	Δgal	Saedler (1967)
<i>E. coli</i> B		Prehm et al. (1975)
<i>E. coli</i> C	type core R1	
<i>E. coli</i> F576	type core R2	
<i>E. coli</i> F635	type core R3	Max-Planck-Institut Freiburg
<i>E. coli</i> F2556	type core R4	
<i>S. arizonae</i>	type core Ra	Pettenkofer Inst. München
<i>E. cloacae</i>	Indikator für Mu G(-)	Hartmann & Goebel (1977)
<i>Serratia</i>		Endow & Roberts (1977)
<i>marcesens</i> Sb		
<i>Proteus vulgaris</i>		
ATCC 9820		Geider
<i>Agrobacterium</i>		
<i>tumefaciens</i> CS83		Geider
<i>Erwinia</i>		
<i>carotovora</i> B374		Toussaint
<i>Erwinia carotovora</i>		
B374, 7.1	Mu G(-) ^r	Toussaint
CSH50/pGP1	pBR322 Bam HI-Bgl II P1 5, Ap ^r Tc ^s	Kamp
DK 1066	CSH50 (MucIts62 gin ⁻ 445-5 G(+))	Kamp et al. (1978)
DK 947	CSH50 (MucIts62 gin ⁻ 445-5 G(-))	Kamp et al. (1978)
DK 954	CSH50 (P1Cmcts 100)	Rosner (1972)
SU 2305	CSH56 (MupApl)	Leach & Symonds (1979)
<i>E. coli</i> C		
(Mu G(-)h101)		Kamp
C600 (D108cts10)		Hull et al. (1978)
Phagen		
MucIts62 Sam		Howe et al. (1979)
MucIts62 Uam		Howe et al. (1979)
P7		Yun & Wapnek (1977)
St-1		Bradley (1970)
T4	am82	Schulz

3.2 METHODEN

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Medien und Puffer

YT-Medium

8g Bacto Trypton
5g Hefeextrakt
5g NaCl
ad 1000ml aqua dest.

YT-Platten

wie YT-Medium, jedoch zusätzlich
15g Bacto Agar

dYT-Medium

wie YT-Medium, jedoch die doppelte
Menge an Bacto Trypton und Hefeextrakt

NA-Weichagar

8g Nutrient Broth
5g NaCl
6,5g Bactro Agar
ad 1000ml aqua dest.

Falls erforderlich wurden den Medien Antibiotika in
folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin:	20mg/l
Chloramphenicol:	25mg/l
Kanamycin:	20mg/l
Streptomycin:	200mg/l
Tetracyclin:	20mg/l

TM-Puffer

10ml 1M Tris-HCl, pH 7,5 (25⁰)
10ml 1M MgSO₄ ad 1000ml aqua dest.

3.2.1.2 Zucht von Bakterien.

Die Bakterien, die für biologische Tests benutzt wurden,
wurden in YT bei 37⁰C oder 32⁰C (lysogene oder temperatur-
sensitive Stämme wie *Erwinia* und *Serratia*) gezogen. Für den
Wachstum der *E. coli* K12 gal E und gal U Stämme wurde M9

Medium (Miller, 1972) mit 1% Glukose verwendet. Die Bakterienkulturen sind bei 4°C mehrere Monate haltbar, wenn sie abzentrifugiert und in TM resuspendiert werden. Die zur Isolierung der Lipopolysaccharide benutzten Stämme wurden in dYT gezüchtet (Laborfermenter).

3.2.1.3 Herstellung von Phagenlysaten.

Ein lysogener Bakterienstamm wurde in 10ml dYT bei 32°C bis zu einer Trübung von 70 bis 80 (Klett-Summerson Colorimeter, 578nm) wachsen gelassen und dann bei 42°C 10 min hitzeinduziert. Die Bakterien wurden anschließend bei 37°C im Wasserbad solange geschüttelt, bis die optische Dichte ein Minimum erreicht hat (ca. 1,5h), dann mit 0,2ml Chloroform versetzt und noch weitere 5 min bis zur vollständigen Lysis geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (5°C, 15 min, 4000g). Die Phagen befinden sich im Überstand.

3.2.1.4 Titerbestimmung von Phagenlysaten.

Vom Lysat wurde eine Verdünnungsreihe in TM hergestellt. 10 µl von jeder Verdünnung wurden auf den Rasen einer geeigneten Indikatorkultur getropft. Die Anzahl der Plaques einer passenden Verdünnung multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ergibt den Titer der Phagenlösung (plaque forming units -PFU/ml).

3.2.1.5 Konstruktion von lysogenen Bakterienstämmen.

0,2ml des zu lysogenisierenden Bakterienstammes wurden

mit 2.5ml warmen NA - Weichagar gemischt und auf eine YT--Platte gegossen. Nach dem Erkalten wurde ein Tropfen einer Phagenlösung auf die Platte gegeben. Nachdem der Tropfen getrocknet war, inkubierte man die Platte über Nacht bei 32°C. Aus der Lysisarea wurden dann durch Ausstreichen auf YT-Platten Einzelkolonien isoliert und diese auf Lysogenie getestet, die durch Phagenproduktion bei 42°C auf einem geeigneten Indikatorstamm erkennbar ist. Trägt der Phage eine Antibiotikaresistenz, so kann auf diese Resistenz selektioniert werden.

3.2.1.6 Isolierung der phagenresistenten Mutanten

Zur Isolierung phagenresistenter Mutanten wurde das Phagenlysate (10^9 PFU/ml) auf einen Bakterienrasen getropft und bei 42°C über Nacht inkubiert. Aus der Lysisarea wurden die resistenten Kolonien entnommen und zur Reinigung auf YT-Platten ausgestrichen. Von einzelnen Kolonien wurden Kulturen bei 37°C angesetzt und auf ihren Gal-Phänotyp und Phagensensitivität charakterisiert.

3.2.1.7 Messung der Plattierungseffizienz.

Es wurde eine 1:10 Verdünnung der Phagensuspension hergestellt. 0,1ml jeder Verdünnung wurden zusammen mit einer Bakteriensuspension des Wirtsstammes oder des zu testenden Stammes inkubiert (10min, 37°C) und anschließend auf YT-Platten ausplattiert. Die relative Plattierungseffizienz (efficiency of plating, E.O.P.) ergab sich aus dem Quotienten des Titers auf der *E.coli*-Mutante und des Titers

auf dem Wildtyp.

3.2 Bereitung der Mu Antiseren

(Buchwald & Siminovitch, 1969).

Eine Phagenlösung (3×10^{10}) wurde mit der gleichen Menge Freund'schen Adjuvands gemischt. Die erste Injektion erfolgte subkutan in die Fußballen eines Kaninchens. In 3 wöchigen Abständen wurden 6 intravenöse Injektionen mit steigenden Phagenmengen gegeben, bis zu einer Dosis von 3×10^{12} Phagen. 6 Tage nach der letzten Injektion wurde das Serum gewonnen.

3.3 Messung der Inaktivierung der Phagen durch LPS.

Es wurde eine Verdünnungsreihe des Lipopolysaccharides mit 0,5; 5; 50; und 500 μ g in 0,1ml TM-Puffer hergestellt und gut suspendiert (Vortex). Diese Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt und dann jede Verdünnungsstufe mit 0,1ml einer Phagensuspension (10^3 PFU/ml) versetzt, gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Mischung mit 0,1ml Indikatorkultur ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht, wurden die Abnahme der Phagenplaques bei steigenden Mengen von LPS ausgewertet. Die I.D.₅₀ gibt die LPS-Menge an, die unter den genannten Bedingungen 50% der Phagen inaktiviert hat.

Die Neutralisierung der Phagen durch Seren erfolgte nach dem gleichen Verfahren, indem von den Seren eine Verdünnungsreihe hergestellt wurde und zusammen mit einer Phagensuspension (10^3 PFU/ml) auf den Indikatorstamm ausplattiert wurde.

3.4 Phagenpräparation

SM-Puffer

20ml 25% NaCl (w/v)

1ml 1M MgSO_4

20ml 1M Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)

ad 1000ml aqua dest.

Nach Autoklavieren Zugabe von

10ml 1% Gelatinelösung (w/v)

Phagen entstehen durch Hitzeinduktion eines lysogenen Stammes. 200ml dYT-Medium wurden in einem 1l-Nasenkolben mit 5ml einer frischen Kultur angeimpft und bei 32°C bis zu einer Lichtundurchlässigkeit von 90-100 (Klett Summerson-Colormeter, 578nm) wachsen gelassen. Nach 15 min Hitzeinduktion bei 42°C wurde solange bei 37°C geschüttelt, bis die Lichtundurchlässigkeit ein Minimum erreicht hat. Nach Zugabe von ca 0,4ml Chloroform schüttelte man noch weitere 5 min und fügte dann MgSO_4 (Endkonzentration 1mM) und DNase (Endkonzentration 2µg/ml) hinzu. Nach Abkühlung im Eisbad zentrifugierte man die Zelltrümmer bei 5°C, und 7000g 30 min ab und fällte die Phagen aus dem Überstand mit 30% Polyethylenglycol-Lösung (w/v; Endkonzentration 10%) und 4M NaCl-Lösung (Endkonzentration 0.4M). Nach 16 Stunden bei 4°C zentrifugierte man den Niederschlag (7000g) ab und resuspendierte in 5 bis 10ml SM-Puffer. Man gibt die Suspension auf einen CsCl-Blockgradienten, bestehend aus CsCl-Lösungen in SM der Dichten 1,4, 1,5, und 1,6 und zentrifugiert 2,5h bei 5°C und 85000g. Die Phagen bilden eine bläulich-weiße Bande

kurz über dem Boden des Zentrifugenröhrchens. Sie werden durch Austropfen isoliert. Zur weiteren Reinigung fugt man CsCl-Lösung der Dichte 1,5 bis zu einem Endvolumen von 5-6ml hinzu und zentrifugiert 14-18h bei 5°C und 120000g. Die Phagen werden isoliert und zweimal gegen 1l SM dialysiert.

3.5 DNA-Präparation

Puffergesättigtes Phenol. 460 g Phenol werden mit 250ml 0,5M Tris-HCl-Puffer, pH 7,9 (25°C) und 0,8g Hydrochinolin gemischt. Man trennt die Phenolphase ab und gibt 100ml des obigen Puffers zu. Die so neutralisierte Lösung kann bei 4°C im Dunkeln längere Zeit stabil aufbewahrt werden.

100 x TE-Puffer, pH 8,0 (25°C)

37,22g EDTA

137g Tris-HCl

16g Tris

ad 1000ml aqua dest.

Eine Phagenlösung mit einer Konzentration von ca 250 µg/ml wurde mit dem gleichen Volumen puffergesättigtem Phenol versetzt und mehrere Minuten vorsichtig geschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und die Phenolphase mit den Phagenproteinen verworfen. Die Extraktion wurde noch zweimal wiederholt und die waßrige Phase mit der Phagen-DNA ausgiebig gegen TE-Puffer dialysiert. Konzentration und Reinheit der DNA wurde durch Messung der UV-Absorption bei 260 und 280nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260nm entspricht einer Konzentration von 50µg/ml; der Quotient der optischen Dichten bei 260 und

280 sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen. Zur Konzentrierung wurde die DNA mit Athanol (-20°C) in Anwesenheit von Na-Acetat (Endkonzentration 300mM) 30 min bei -80°C gefällt. Der Niederschlag wurde 10 min bei 4°C zentrifugiert, mit 70 %igem Athanol gewaschen und in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die gewünschte DNA-Konzentration wurde dann mit TE-Puffer eingestellt: es empfiehlt sich eine Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$.

Plasmidpräparationen wurden nach Stougaard & Molin (1981) durchgeführt.

3.6 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

(Cohen et al., 1972)

Zur Präparation kompetenter Zellen impft man 20 dYT-Medium mit 0,5ml einer frischen Kultur an und läßt bei 32°C (lysogene Stämme) oder 37°C bis zu einer optischen Dichte von 100 wachsen. Nach dem Abzentrifugieren (0°C , 15 min, 4000g) resuspendiert man in 10ml TM, zentrifugiert wie oben und resuspendiert in kalter 0,05M CaCl_2 -Lösung. läßt 30 min stehen. zentrifugiert die Zellen ab und nimmt erneut in 1ml 0,05M CaCl_2 auf. Sollen die kompetenten Zellen eingefroren werden, so resuspendiert man in 1ml 0,05 M CaCl_2 , das 10% Glycerin enthält und verwahrt die Zellen bei -80°C . 0,2ml der kompetenten Zellen und 0,5-1 μg DNA werden zusammen in vorgekühlte Röhrchen gegeben. Man läßt 40 min bei 0°C stehen, erhitzt 5 min auf 37°C (lysogene Stämme) bzw. 42°C und kühlt erneut 10 min im Eisbad. Danach gibt man 1,8ml dYT-Medium zu und läßt die Kultur bei 32°C bzw. 37°C 1 h

wachsen. Anschließend werden die Transformanten nach geeigneten genetischen Markern selektioniert.

3.7 DNA-Analyse

3.7.1 Restriktionsanalyse

Puffer

10 x LS (Niedrigsalz)-Puffer	10 x MS (Mittelsalz)-Puffer
10mM Tris-HCl, pH 7,4 (25°)	10mM Tris-HCl, pH 7.4 (25°C)
10mM MgSO ₄	50mM NaCl
1mM Dithiothreitol	10mM MgSO ₄
	1mM Dithiothreitol

10 x HS (Hochsalz)-Puffer

50mM Tris-HCl, pH 7,4 (25°C)
 100mM NaCl
 10mM MgSO₄

Die Verdauung mit den Restriktionsendonukleasen wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt: für einen Testlauf wurde 1µg DNA benutzt und für die Isolierung eines Fragmentes wurden 15-25µg DNA mit Enzym behandelt. Abhängig von Enzym wurden unterschiedliche Puffer (LS-, MS-, oder HS-Puffer) verwendet. Alle Inkubationen erfolgten bei 37°C bei einer Dauer von 2-4h. Nach Zugabe von Saccharose (Endkonzentration 10%) und Bromphenolblau (Endkonzentration 0,025%) wurden die Proben je nach Größe der zu erwarteten Fragmente auf Agarosegele (0,7-2%) aufgetragen.

3.7.2 Gelelektrophorese

10 x E

48,46g Tris

50ml 1M NaOH

3,73g EDTA

22ml Eisessig

ad 1000ml aqua dest.

Zur Herstellung der Gele wurde die gewünschte Menge Agarose in 1xE-Puffer durch Erhitzen im siedenden Wasserbad vollständig gelöst. Ethidiumbromid wurde in einer Konzentration von 0,5mg/ml zugesetzt. Das Gel ist dann nach 4-6h verwendbar. Die Elektrophorese erfolgte in E-Puffer bei 120V; die Elektrophoresedauer betrug ca. 5 Stunden.

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des Ethidiumbromids mit kurzwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und durch ein Orangefilter (Kodak No.2) mit Polaroidfilm 55P/N oder 57P/N photographiert.

Die Größen der einzelnen DNA-Fragmente kann aus der Wanderungsgeschwindigkeit in Agarosegelen berechnet werden. Der Logarithmus der Basenzahl ist näherungsweise proportional ihrer relativen Beweglichkeit. Als Größenmarker dienten die Hind III-Fragmente von Lambda-DNA (Sänger et al., 1982), bekannte Fragmente aus pBR322 (Sutcliffe, 1978) oder Mu-DNA (D. Kamp, pers. Mitteilung).

3.7.3 Sequenzierung (Maxam & Gilbert, 1980)

3.7.3.1 Dephosphorylierung

Phosphatase Puffer:

121,1g Trizma Base

51,35g Borsäure

3,72g EDTA ad 1000ml aqua dest.

Die Gellösungen wurden mit 0.5ml Ammoniumpersulfat (10%) und 30 μ l N,N,N',N',-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) versetzt und auf die silikonisierte (Silan GF31, Wacker Chemie) Platte gegossen, während die mit Dichloro-dimethyl-silan (Hopkin & Williams) behandelte Ohrenplatte darüberschoben wurde.

Als Laufpuffer wurde 0,1 M TBE verwendet. Die Laufzeiten betrugen 1 bis 5 Stunden bei 3000 V (20%iges Gel) bzw. 2200 V (8%ige und 6%ige Gele). Nach dem Lauf wurden die Gele in 10% Essigsäure 10 min fixiert und bei 60°C 90 min getrocknet. Die 20 %igen Gele wurden nicht fixiert und getrocknet. Statt dessen wurden die 20 %igen Gele mit Klarsichtfolie überzogen. Die Gele wurden zusammen mit Autoradiographie-Filmen (Kodak XR-5) in lichtdichte Kassetten verpackt und bei -80°C aufbewahrt. Je nach der Menge an eingebauter Radioaktivität konnten die Autoradiogramme nach einem Tag bis zwei Wochen entwickelt werden.

3.8 LPS-Analyse

3.8.1 Isolierung des Lipopolysaccharides.

Aus den mit Aceton getrockneten Bakterien wurde das LPS durch Phenol/Chloroform/Petroläther (Galanos et al., 1969) oder durch Phenol/Wasser (Westphal & Jann, 1965) extrahiert und durch Ultrazentrifugation bei 100000g gereinigt. Die erste Prozedur wurde für R-Stämme und die Phenol/Wasser Methode für S-Stämme wie *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Agrobacterium tumefaciens* benutzt. Mit der Ausnahme von *Enterobacter* LPS (0,1%) betrug die Ausbeute zwischen 1% und 3%.

3.8.2 Pronase-Behandlung

LPS wurde in Tris-Acetat Puffer (10ml, pH 7,5) gelöst und mit Pronase (Verhältnis Substrat/Enzym 20:1) bei 37°C inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Mischung 15 min. auf 100°C erhitzt.

3.8.3 Perjodatoxidation.

50mg LPS wurden in 2,5ml Wasser gelöst, mit 2,5ml 0,02 M NaJO_4 versetzt und 100 Std. bei 4°C im Dunkeln gelassen. Danach wurde 0,5ml Äthylenglykol zugesetzt, um überschüssiges Perjodat zu zerstören.

3.8.4 KDO-Bestimmung

(Waravdekar & Saslaw, 1959)

Proben mit 0,01 - 0,05 μMol KDO wurden 8min. in 100 μl 0,25

$\text{N H}_2\text{SO}_4$ auf 100°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur gebracht. Nach Zusatz von 50 μl 0,1 N wässriger HJO_4 -Lösung wurde die Probe 10min. auf 55°C erhitzt. Danach wurden 200 μl 4% Natriumarsenit in 0,5 N HCl und zur Entwicklung der Farbe 800 μl einer 0,6% wässrigen Thiobarbitursäurelösung zugefügt. Nach 10min. bei 100°C wurde der Farbstoff mit 1ml Butanol (5% konz. HCl) extrahiert. Die Extinktion der butanolischen Phase wurde bei 552 und 508nm gemessen.

3.8.5 Isolierung des Oligosaccharides aus dem LPS.

100mg LPS wurden in 20ml 1%iger Essigsäure 1 h bei 100°C degradiert. Das ausflockende Lipid A wurde abzentrifugiert 4000g 30 min und der Überstand lyophilisiert. Das Oligosaccharid wurde saulenchromatographisch gereinigt (Sephadex G50)

Säulendimension 86cm/1.4cm

Elutionsvolumen $V_0=34\text{ml}$

$V_i=80\text{ml}$

Elutionsmittel: 10ml Pyridin, 4ml Essigsäure auf 1l Wasser

Elutionsgeschwindigkeit 6ml/h.

Die Fraktionen wurden mit dem Phenol-Schwefelsäure-Test auf Zuckergehalt überprüft.

3.8.5.1 Phenol-Schwefelsäure-Test.

Zu 80 μl einer Fraktion wurden 0.5ml Wasser und ein Tropfen 80%iges Phenol gegeben. Zu dieser Mischung wurden 1.25ml konz. H_2SO_4 zugetropft. Nach 15 min bei Raumtempera-

tur und 15 min bei 60°C wurde die Extinktion gemessen (485nm).

Glucosamin-Bestimmung wurde nach Strominger et al. (1959) durchgeführt, wobei LPS mit 6N HCl, 18 h bei 100°C hydrolysiert wurde.

3.8.5.2 Quantitative Analyse des Oligosaccharids

(Holme et al. 1968).

1 mg Lipopolysaccharid bzw Oligosaccharid wurden in 1ml 0,5 N HCl gelöst und im zugeschmolzenen Reagenzglas 18 Stunden bei 90°C hydrolysiert. Nach dem Öffnen des Röhrchens wurde 0,1mg Xylose in 0,1ml Wasser als interner Standard hinzugefügt. Die Probe wurde in einen Schliffkolben überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,5ml 0,1 N NaOH bei 0°C gelöst und mit 2 mg NaBH_4 (100 μl einer Lösung von 10 mg/0,5ml) versetzt. Die Zucker wurden über Nacht bei 4° C zu den Alditolen reduziert. Überschüssiges NaBH_4 wurde durch Zugabe von einigen Tropfen Essigsäure zerstört. Anschließend wurde die Lösung am Rotationsverdampfer einrotiert. Zum Rückstand wurden 0,3ml Methanol gegeben und am Rotationsverdampfer wieder abgezogen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Der Rückstand wurde in je 0,3ml Pyridin und Essigsäureanhydrid suspendiert und 30 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 1ml Wasser und 1ml Chloroform hinzugefügt und geschüttelt. Die Chloroformphase wurde noch zweimal mit Wasser geschüttelt und im Stickstoffstrom eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,1ml Chloroform gelöst.

Davon wurden 3 μ l in den Gaschromatographen (Hewlett-Packard Model 5840A, Gaschrom Q Säule mit 3% ECNSS-M) injiziert. Die Alditolacetate wurden durch ihre Retentionszeiten identifiziert. Es wurde eine Mischung von bekannten Alditolacetaten als Referenz benutzt, deren "Response-Faktoren" wurden bestimmt.

3.8.5.3 Abspaltung des Phosphats.

100mg Oligosaccharid wurden mit 2ml 60%iger Flußsaure 30 min bei 0°C dephosphoryliert (Lipkin et al., 1969). Die Lösung wurde lyophilisiert und das Oligosaccharid durch Säulenchromatographie gereinigt (Sephadex G50)

3.8.5.4 Bestimmung der anomeren Konfiguration

(Hoffman et al., 1972).

6mg Oligosaccharid bzw LPS und 2 mg meso-Inositol als interner Standard wurden in 1ml Wasser gelöst. Davon wurden 0,2ml als Referenzprobe entnommen. Der Rest der Lösung und die Referenzprobe wurden getrocknet und 1h bei 100°C in Pyridin/Acetanhydrid (1:1) acetyliert. Nach dem Abdampfen des überschüssigen Lösungsmittels wurde die zu bestimmende Probe in 1ml Eisessig gelöst und mit 100mg CrO_3 90 min bei 50°C im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde der acetylierte Zucker mit 5ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert (3x5ml). Nach dem Einengen des Lösungsmittels wurde eine gaschromatographische Zuckeranalyse durchgeführt.

3.8.5.5 Methylierung der Neutralzucker

(Stellner et al.. 1973)

20mg des dephosphorylierten Oligosaccharids wurde bei 45°C über P_2O_5 im Vakuum getrocknet und anschließend unter getrocknetem Stickstoff in 1ml wasserfreien DMSO gelöst. Diese Lösung wurde mit 1ml 2M NaH in DMSO 4h im Ultraschallbad behandelt. Zu der Mischung wurde dann im Eisbad 1-2ml Methyljodid zugegeben und noch 1 h im Ultraschallbad behandelt. Die Mischung wurde dann am Rotationsverdampfer eingeeengt und in Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde mit Wasser gewaschen und eingedampft. Dann wurde der Rückstand in 0,3ml Athanol/Chloroform (2:1) gelöst und über eine Sephadex LH_{20} -Säule aufgetragen (40cm/1cm; Elutionsvolum $V_0=30$ ml: Elutionsmittel Athanol/Chloroform 2:1).

Mit dem Phenol-Schwefelsäure-Test wurde das methylierte Oligosaccharid identifiziert. Dann wurde es mit 0,3ml 95 %iger Ameisensäure, 0,5 N H_2SO_4 16h bei 100°C hydrolysiert. Nach Zugabe von 0,3ml Wasser wurde das Oligosaccharid weitere 5 Stunden hydrolysiert. Die Lösung wurde auf eine kleine Amberlit Ag3X4 Ionenaustauschersäule aufgetragen und mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde bei 30°C eingedampft, in 0,2ml 0,1ml N NaOH aufgenommen und mit 2mg $NaBH_4$ über Nacht bei 4°C reduziert. Die Lösung wurde mit 1 Tropfen Essigsäure angesäuert, eingedampft und viermal mit Methanol zur Trockene eingeeengt. Zum Rückstand wurden je 0,2ml Pyridin und Acetanhydrid gegeben und 30 min bei 100°C acetyliert. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockene einge-

dampft und zur Gaschrommatographie in 50 μ l Chloroform aufgenommen. 1 μ l dieser Lösung wurde in den Gaschromatographen injiziert.

3.9 Computer-analyse

Das NAQ Programm (Dayhoff et al., 1981, 1983) wurde zur Erstellung von Restriktionskarten, Identifizierung von Leserahmen und Translation von DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen benutzt. Sequenzvergleiche wurden durch das Programm BESTFIT (University of Wisconsin Genetics Computer Group) erstellt.

4. RESULTATE

4.1 UNTERSUCHUNG DER REZEPTORSTRUKTUR FÜR MU-PHAGEN

4.1.1 Lipopolysaccharid als rezeptoraktive Substanz für die Mu-Phagen

Es ist bekannt, daß Mu und P1 überlappende Wirtsbereiche haben (Toussaint et al., 1978) und daß P1 LPS als rezeptoraktive Komponente der Zellwand erkennt (Ornellas & Stocker, 1974). Dies läßt die Annahme zu, daß Mu ebenfalls für seine Adsorption an der Wirtszelle eine bestimmte LPS-Struktur benötigt. Um festzustellen, ob LPS als Rezeptor von Mu erkannt wird, wurde seine Phageninaktivierende Wirkung getestet.

Schon in sehr geringer Konzentration verhindert aus *E.coli* K12 bzw. *Enterobacter cloacae* isoliertes LPS das Wachstum von Mu G(+) bzw. Mu G(-) Phagen (Tabelle 2). Dagegen zeigt LPS, das aus wirtsfremden Stämmen isoliert wurde, selbst in hoher Konzentration keine Wirkung.

Tabelle 2

Inaktivierung des Phagen Mu durch LPS

Phage	I.D.50 (µg/ml LPS)	
	<i>E.coli</i> K12	<i>Enterobacter cloacae</i>
Mu G(+)	3,5	> 5000
Mu G(-)	>5000	5

LPS wird nach den beschriebenen Methoden immer mit einer geringen Menge an Protein coextrahiert (hier 1,4%). Um die Beteiligung dieses Proteinanteils an der Phageninaktivierung auszuschließen, wurde das Lipopolysaccharid mit Pronase behandelt und auf seine Aktivität getestet. Eine Verminderung konnte dabei nicht festgestellt werden (Tabelle 3). Wenn dagegen das Lipopolysaccharid mit Natriumperiodat behandelt wurde, das die Bindung zwischen benachbarten $-COH$ in Kohlenhydraten spaltet (Spiro, 1966), wurde seine inaktivierende Wirkung aufgehoben (Tabelle 3).

Tabelle 3

Einfluß von Pronase und $NaJO_4$ auf die Aktivität von LPS

Behandlung	% von Überlebenden Phagen
-	100
LPS	0,3
LPS + pronase	0,6
100°, 15'	
LPS 100°, 15'	1,6
LPS oxidiert	100

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß sich der Rezeptor für die Phagenabsorption und Inaktivierung in dem Polysaccharidanteil befindet.

4.1.2 Charakterisierung des Rezeptors von Mu G(+)-Phagen

Um den Rezeptor des Phagen Mu G(+) lokalisieren zu können, wurde das LPS verschiedener core-Typen auf seine inaktivierende Wirkung getestet. Andererseits wurden Mu G(+)-resistente *E.coli* K12-Mutanten isoliert und deren Lipopolysaccharide auf die Anwesenheit des Rezeptors analysiert.

4.1.2.1 Inaktivierung durch Lipopolysaccharid aus verschiedenen core-Typen.

Salmonella arizonae, *E.coli* F576, *E.coli* F635, *E.coli* F2556 (R-Stämme), *E.coli* C, *E.coli* B, und *E.coli* K12 C600 besitzen Lipopolysaccharide verschiedener core-Typen (Galanos et al., 1977; Jansson et al., 1981). Aus diesen Stämmen wurde LPS extrahiert, gereinigt und auf Anwesenheit des Mu G(+) Rezeptors getestet (Tabelle 4).

Nur Lipopolysaccharide aus *S.arizonae* Ra und *E.coli* R2, die dem *E.coli* K12-LPS ähneln, inaktivieren den Mu G(+) Phagen. Aber *S.arizonae*-LPS ist 50 mal weniger effizient als *E.coli* K12-LPS. Dieses Resultat stimmte mit der entsprechend niedrigeren Plattierungseffizienz des Phagen auf *S.arizonae* überein. Die Resistenz des Mu G(+)-Phagen gegen die anderen Stämme läßt sich nur durch das Fehlen des Rezeptors auf der Zelloberfläche erklären und nicht durch eine fehlende Permissivität.

4.1.2.2 Inaktivierung durch LPS mit defektem "core" aus *E. coli* K12 Stämmen.

Um den Rezeptor des Mu G(+)-Phagen auf dem Lipopolysaccharid zu lokalisieren, wurde LPS mit defektem "core" aus zwei *E. coli* K12-Stämmen getestet. Die genaue Struktur dieser Lipopolysaccharide ist bekannt (Prehm, 1976).

Diese Stämme sind defekt in der Nucleotidzuckersynthese als Folge einer Mutation in dem *gal E* bzw. *gal U* Gen. Beim *gal E*-LPS fehlt die terminale Glucose und die seitenständige Galactose des Wildtyps, während *gal U*-LPS nur aus Heptose und KDO aufgebaut ist. Beide Lipopolysaccharide inaktivieren den Mu G(+)-Phagen nicht, der Rezeptor muß also abwesend sein (Tabelle 5).

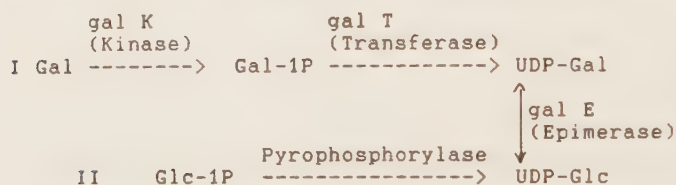
Tabelle 5

Phageninaktivierung durch LPS aus *E. coli* K12-Mutanten.

<i>E. coli</i> K12	LPS-Struktur *	ID ₅₀ (LPSµg/ml)
wild type	$ \begin{array}{ccccccc} \text{GlcNAc} & & & \text{Gal} & & & \\ \beta 1,6 & & & \alpha 1,6 & & & \\ & & & \alpha 1,3 & & & \\ \alpha 1,2 & \alpha 1,3 & & \alpha 1,3 & \alpha 1,3 & & \\ \text{Glc} \text{---} \text{Glc} \text{---} \text{Glc} \text{---} \text{Hep} \text{---} \text{Hep} \text{---} \text{KDO} & & & & & & \\ & & & & 1,7 & & \\ & & & & \text{Hep} & & \end{array} $	2,5
<i>gal E</i>	$ \begin{array}{ccccccc} & \alpha 1,3 & \alpha 1,3 & \alpha 1,3 & & & \\ & \text{Glc} \text{---} \text{Glc} \text{---} \text{Hep} \text{---} \text{Hep} \text{---} \text{KDO} & & & & & \\ & & & & 1,7 & & \\ & & & & \text{Hep} & & \end{array} $	>5000
<i>gal U</i>	$ \begin{array}{ccccccc} & & & \alpha 1,3 & & & \\ & & & \text{Hep} \text{---} \text{Hep} \text{---} \text{KDO} & & & \end{array} $	>5000

* Die letzte Glc ist in *E. coli* K12-LPS mit GlcNAc partiell substituiert (hier 15%).

Jedoch hat sich gezeigt, daß die Aktivität des Lipopolysaccharides von den Wachstumsbedingungen der *gal* E-Mutante abhängig ist. Der Grund dafür ist, daß die Vorstufe für die Synthese des kompletten "cores", UDP-Gal, auf zwei verschiedenen Wegen in den Zellen hergestellt werden kann.



Wenn Galactose als einzige Kohlenstoffquelle im Medium vorhanden ist, wird UDP-Gal auf dem ersten Syntheseweg gebildet. In Abwesenheit von exogener Galactose dagegen entsteht UDP-Gal aus UDP-Glc; dieser Schritt wird durch Epimerase katalysiert. Eine Deletion im *gal* E-Gen zerstört die Epimerase, was zur Synthese eines galactosefreien "cores" führt (Osborn & Rothfield 1971). Tatsächlich wurde festgestellt, daß in synthetischem Minimalmedium ohne Galactose der *gal* E-Stamm ein inkomplettes Lipopolysaccharid herstellt. Im Vollmedium (dYT) dagegen, das nur Spuren von Galactose enthält, wird ein komplettes Wildtyp-LPS gebildet. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund überein, daß der *gal* E-Stamm, wenn er im dYT Medium gewachsen ist, sensitiv gegen Mu ist und nicht sensitiv nach Wachstum im Minimalmedium.

Die gleiche Korrelation zwischen Gal Phänotyp und Phagen-sensitivität wurde auch bei dem *E. coli* S1652 Stamm gefunden. Wegen einer Deletion im *gal*-Operon sind in diesem Stamm beide Synthesewege für UDP-Gal blockiert. Der Stamm ist auch in Vollmedium gegen Mu resistent. Die Sensitivität gegen Mu

konnte durch Kreuzung mit einem *E.coli* HfrH 165-Stamm wieder hergestellt werden. Alle 20 Gal⁺- Rekombinanten, die auf Minimal-Gal-Streptomycin-Platten (Miller, 1972) selektioniert wurden, waren Mu-sensitiv.

Das Fehlen von Galactose im Lipopolysaccharid kann auch durch einen Defekt im *rfa* "cluster" verursacht werden. Die *rfa*-Gen-Produkte kontrollieren den Zusammenbau des LPS-cores (Osborn & Rotfield, 1971). *E.coli* B, ein Gal⁺- und *rfa*⁻-Stamm, synthetisiert ein inkomplettes "core", das identisch mit dem "core" des S1652- und *gal* E- Stamms (Pehm et al., 1975) ist. Mu G(+) macht auf *E.coli* B keine Plaques und wird von dessen LPS nicht inaktiviert. Somit ist Galactose im Lipopolysaccharid mit der Sensitivität gegen Mu korreliert.

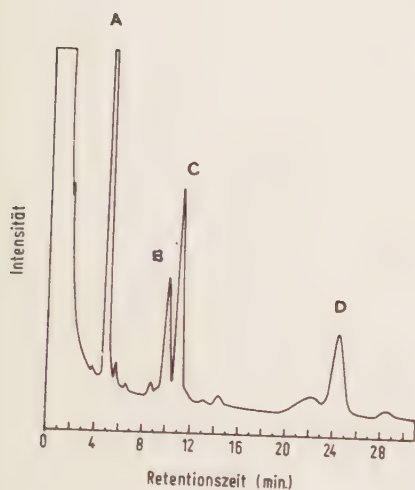
4.1.2.3 Isolierung von Mu resistenten *E.coli* K12-Mutanten.

Mutanten des Stammes *E.coli* K12 C600 wurden auf Resistenz gegen Mu G(+) selektioniert. Von 40 unabhängig isolierten Mutanten waren 2 auch gegen D108 resistent. Umgekehrt sind alle 50 *E.coli* K12-Mutanten, die als Resistente gegen D108 isoliert wurden, auch gegen Mu G(+) resistent. Dieser Befund bestätigt die frühere Behauptung, daß die beiden Phagen, deren Genome größtenteils homolog sind, überlappende Wirtsbereiche haben. (Hull et al., 1978). Auch von S1652 wurden D108-resistente Mutanten isoliert. Dieser Stamm ist resistent gegen Mu und sensitiv gegen D108. Die Inaktivierung des Phagen mit gereinigtem Lipopolysaccharid weist darauf hin, daß die meisten dieser phagenresistenten

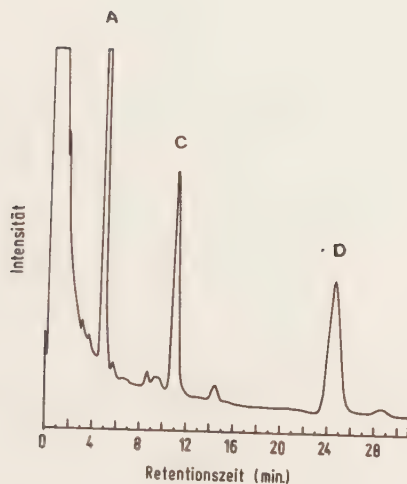
Mutanten tatsächlich Rezeptormutanten sind. Eine bestimmte phagenresistente Mutante, S1652 D108^r#3 synthetisiert allerdings ein aktives Lipopolysaccharid. Die Mutation in S1652 D108^r#3 betrifft nicht die Rezeptorstruktur, sondern notwendige Faktoren bei der Phagenmultiplikation.

4.1.2.4 Biochemische Charakterisierung der Mu-resistenten Mutanten.

Um den strukturellen Grund für die Resistenz gegen Mu G(+) festzustellen, wurde die Zuckerzusammensetzung von LPS aus resistenten Stämmen gaschromatographisch analysiert (Abb. 4). Es konnten sechs Mutanten-Klassen mit unterschiedlich inkomplettem "core" unterscheiden und auf Grund der Zuckerverhältnisse mögliche Strukturen vorgeschlagen werden (Tabelle 6).



I



II

Abb. 4 Gaschromatogramme der Alditolacetate aus den Lipopolysacchariden der E.coli K12-Mu^r-Mutanten:

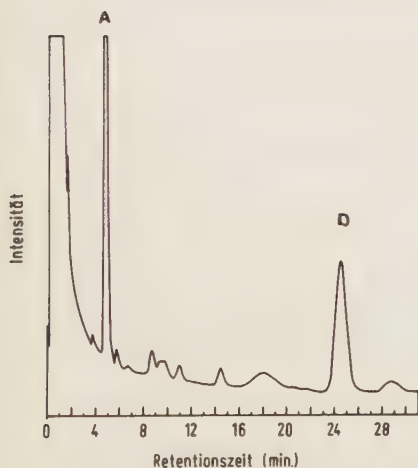
I Mu^r # 10
II Mu^r # 31
III Mu^r # 102

A - Xylose als interner Standard (0,1mg)

B - Galactose

C - Glucose

D - Heptose



Gaschromatograph: Hewlett

Packard-Modell 5840A

Säule: 3% ECNSSM-M

auf Gaschrom Q

Trärgas: N₂ bei 30ml/min

Temperatur: 180°C isotherm

III

Tabelle 6

Zuckerzusammensetzung von LPS aus *E. coli* K12-Mutanten

Stamm	Zuckerzusammensetzung (%)					Molar Verhältnis		Vorgeschlagene Struktur *
	Gal	Glc	Hep	KDO	GlcN	Gal	Glc	
<i>E. coli</i> K12 C600 Wildtyp	3,4	10,7	10,5	10,5	11,0	1	2,7	3,2 Glc-Glc-Hep-Hep-KDO GlcNac Gal Hep
Gruppe I								
Mu ^r #4	3,6	6,0	6,5	9,9	8,0	1	1,7	2
Mu ^r #10	2,9	6,9	7,1	8,7	7,6	1,2	3	2,8 Glc-Glc-Hep-Hep-KDO Gal Hep
Gruppe II								
SI652	0	6,2	8,8	9,7	nd	0	2	3,2 Hep
SI652	0	5,4	7,3	6,5	nd	0	2	3 Glc-Glc-Hep-Hep-KDO Hep
D108 ^r #3								
Gruppe III								
D103 ^r #10	1,1	1,2	2,0	5,3	7,7	1	1	2,1 Glc-Hep-Hep-KDO Gal Hep
D108 ^r #13	3,1	4,2	7,3	8,3	9,7	1	1,4	2,7 Gal Hep
D108 ^r #25	3,5	5,0	8,0	8,3	8,5	1	1,4	2,7 Gal Hep
Gruppe IV								
Mu ^r #31	0	5,1	8,4	8,8	8,9	0	1	1,7 Glc-Hep-Hep-KDO
Mu ^r #31	0	4,8	7,1	10,0	8,9	0	1	2,2 Glc-Hep-Hep-KDO
Gruppe V								
Mu ^r #38	0	0,2	7,9	9,5	9,4	0	0	2,1 Hep-Hep-KDO
Mu ^r #12	0	0,2	6,5	8,3	9,7	0	0	1,6 Hep-Hep-KDO
Mu ^r #102	0	0,2	9,3	7,2	8,2	0	0	2,8 Hep-Hep-KDO
Gruppe VI								
SI652 D108 ^r #2	0	0	0	13,8	nd			KDO

* Die Werte sind in Prozent des Trockengewichts angegeben. Die molaren Verhältnisse beziehen sich auf drei KDO-Einheiten und zwei Glucoseein-Einheiten des Lipids A

Es wurden alle inkompletten core-Typen erhalten außer dem einen Typ, bei dem ausschließlich die verzweigte Galactose fehlt. Dies bestätigt frühere Ergebnisse, daß Galactose für den Einbau der endständigen Glucose notwendig ist (Osborn, 1968; Osborn & Rothfield, 1971). LPS-Mutanten, die nur eine Glucose und eine Galactose enthalten (Gruppe III), wurden auch bei *Salmonella* isoliert (Wilkinson & Stocker, 1968), Mutanten mit nur einer Glucose (Gruppe IV) auch von *E. coli* B (Prehm et al., 1975, 1976). Gruppe V umfaßt Mutanten, die ein Lipopolysaccharid ohne äußeres "core" synthetisieren; nur Spuren von Glucose wurden gefunden.

Da die Resistenz von S1652 gegen Mu im Zusammenhang mit der Deletion in *gal*-Operon steht, wurden auch alle Mutanten auf einen Gal^- -Phänotyp getestet. Nur die Mutanten der Gruppe V erwiesen sich als Gal^- .

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, daß die endständige 1-2 gebundene Glucose die tatsächliche Erkennungsstelle für den Phagen ist, während Galactose für die Synthese eines kompletten "cores" nötig ist.

4.1.2.5 Phagentypisierung der Rezeptormutanten.

Die Rezeptormutanten wurden auf ihre Sensitivität gegenüber folgenden Phagen untersucht: P1, P7 und St1. Wie Mu und D108, infizieren diese Phagen *E. coli* K12.

St1 ist ein einzelsträngiger DNA-Phage (Bradley, 1970), der nicht mit Mu verwandt ist. Die Mu-resistenten Mutanten werden nicht von ihm infiziert; genauso kann der Phage Mu Mutanten, die als St1-resistente isoliert wurden, nicht

infizieren.

Ferner wurde festgestellt, daß *E.coli* K12-Mutanten der Gruppen I, II und IV sensitiv gegen D108, P1 und P7 sind (Tabelle 7). Im Gegensatz zu Mu ist für die Adsorption dieser Phagen eine endständige Glucose, unabhängig von der Art ihrer glykosidischen Bindung ausreichend. Die Mutanten der Gruppe V sind ausschließlich gegen P7 resistent, während die der Gruppen III und VI gegen alle getesteten Phagen resistent sind.

Bei den Mutanten der Gruppe V und bei der Mutante #4 wurde festgestellt, daß die Daten der Plattierungseffizienz nicht mit denen der Phageninaktivierung durch LPS übereinstimmen. Dies läßt sich mit der "leakiness" der Mutanten erklären. Im Fall der Gruppe V genügen Spuren von Glucose (Tabelle 6) unter den Plattierungsbedingungen für die Adsorption der Phagen D108 und P1; für die Inaktivierung der Phagen ist diese geringe Menge an Glucose dagegen nicht ausreichend. Sowohl bezüglich ihrer LPS-Struktur und -Aktivität als auch bezüglich ihrer Phagensensitivität nimmt die Mutante #4 eine Position zwischen der Gruppe I und der Gruppe III ein. Nur ein Teil der LPS-Moleküle besitzt eine endständige 1-3 Glucose, der wieder für die Plattierung der Phagen D108 und P1 ausreicht, aber nicht für deren Inaktivierung. Für P7-Phagen stimmen die Daten der Plattierungseffizienz und des LPS-Bindungstests sowohl für die Mutanten der Gruppe V, als auch für die Mutante.

Tabelle 7

Sensitivität der *E.coli* K12-Mutanten für andere Phagen

<i>E.coli</i> K12 Stämme	E.O.P			Inaktivierung durch LPS (% von überlebenden Phagen) *		
	D108	P1	P7	D108	P1	P7
Wild Typ	1	1	1	0	2	3,8
Gruppe I						
Mu ^r #4	0,4	1	5,10 ⁻⁶	74	80	100
Mu ^r #10	0,5	0,3	1	0	1,6	34
Gruppe II						
S1652	1	1	0,2	5,5	0	0,8
S1652	<10 ⁻⁶	1	1	0	1,1	0,2
D108 ^r #3						
Gruppe III						
D108 ^r #10	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁸	100	100	81
D108 ^r #13	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁸	77,8	100	124,5
D108 ^r #25	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁸	69,4	100	74,5
Gruppe IV						
Mu ^r #31	0,3	1	1	6,9	3,5	3,8
Mu ^r #35	1	0,5	1	1,4	0	0
Gruppe V						
Mu ^r #38	1	1	<10 ⁻⁶	70,9	72	100
Mu ^r #12	0,3	1	<10 ⁻⁶	43	45	100
Mu ^r #102	0,4	1	<10 ⁻⁶	62	89	100
Gruppe VI						
S1652	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁸	72	76	81
D108 ^r #2						

* LPS-Konzentration -2,5mg/ml

4.1.2.6 Kohlenhydrate als Inhibitoren der Phagenadsorption

Bei dem T4 Phagen, der eine endständige 1-3 gebundene Glucose als Rezeptor erkennt (Prehm et al., 1976), wurde schon früher eine Korrelation zwischen der Rezeptorstruktur und der Phageninhibition durch solche Zucker gefunden, die dem Rezeptor in der Zusammensetzung und Konfiguration ähnlich sind (Dawes, 1975). Nach einem solchen Zusammenhang wurde auch bei den Phagen Mu gesucht. Die hemmende Wirkung verschiedener Mono-, Di-, und Trisaccharide auf die Mu-Adsorption wurde entsprechend der Methode von Dawes (1975) untersucht.

Tabelle 8

Hemmung der Adsorption des Mu-Phagen durch Zucker.

Zucker (Endkonzentration 0,6 M)	Hemmung der Phagenadsorption %
Glucose	18
1 α - Methylglucose	20
1 β - Methylglucose	<10
Threhalose (Glc $\xrightarrow{\alpha 1,1}$ Glc)	40
Gentiobiose (Glc $\xrightarrow{\beta 1,6}$ Glc)	80

3-O-Methylglucose, 1- α -Methylgalactose, 1- β -Methylgalactose, Maltose, Sucrose, Melibiose und Raffinose hatten keinen Einfluß auf die Mu-Adsorption. Während die Adsorption von T4-Phagen durch freie oder endständige Glucose verhindert wird (Dawes, 1975), ist für die Adsorption des Mu G(+)-Phagen die Art der Glucose-Bindung im LPS entscheidend.

4.1.3 Charakterisierung des Rezeptors von Mu G(-)-Phagen

Da der Mu G(-) Phage nicht auf *E.coli* K12 wachsen kann, ist zu erwarten, daß er eine andere Struktur als Rezeptor erkennt, als Mu G(+). Sensitive Stämme wie *E.cloacae* und *Erwinia carotovora*, wurden bezüglich ihrer LPS Struktur bislang nicht untersucht. Um den Rezeptorbereich im LPS lokalisieren zu können, war eine Strukturaufklärung nötig.

4.1.3.1 Untersuchung von LPS aus sensitiven Stämmen.

Lipopolysaccharide aus den gegen Mu G(-) sensitiven Stämmen wurden extrahiert, gereinigt und auf eine phageninaktivierende Wirkung getestet (Tabelle 9). Die Zugabe dieser Präparate zu dem Lysat verhinderte die Phagenbindung an der Zellwand.

Tabelle 9

Phageninaktivierung durch LPS

LPS	überlebende Phagen (%)
-----	------------------------

<i>Enterobacter cloacae</i>	0
<i>Serratia marcescense</i>	0,3
<i>Proteus vulgaris</i>	0,4
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8

Obwohl Mu G(-) Phagen von Lipopolysacchariden aus *A.tumefaciens* und *P.vulgaris* inaktiviert wurden, zeigten sie keine Plaques in Plattierungsexperimenten. Die Resistenz

könnte auf dem Fehlen der in der Phagenvermehrung wirkenden Faktoren beruhen. Dieser Befund erinnert an die abortive Infektion von *Serratia* und *Pseudomonas aeruginosa* mit P1-Phagen (Amati, 1962).

Die Zuckerzusammensetzung der Lipopolysaccharide wurde gaschromatographisch analysiert (Tabelle 10).

Tabelle 10

Die Zuckerzusammensetzung von LPS ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

Stamm	Glc	Gal	Man	Rha	GlcN	Hep
<i>Enterobacter cloacae</i>	50,4	2,4	9,5	-	30,1	17,2
<i>Serratia marcescens</i>	141,3	-	34,2	42,4	n.d.	126,2
<i>Proteus vulgaris</i>	49,1	-	-	-	n.d.	50,5
<i>Erwinia carotovora</i>	36,4	-	2,1	-	n.d.	35,1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48,1	70,2	132,1	65,3	25,1	-

Als einzige gemeinsame Komponente wurde Glucose in signifikanter Menge gefunden. Wie bei Mu G(+) konnte also Glucose auch bei Mu G(-) den Rezeptor bilden, in anderer als der 1-2 glycosidischen Bindung.

4.1.3.2 Lipopolysaccharid von *Enterobacter cloacae*.

LPS von *Enterobacter cloacae* läßt sich nur mit der Phenol-Wasser Methode (Westphal & Jann, 1965) und in sehr geringer Ausbeute extrahieren (0,1%). Weil seine Struktur noch nicht bekannt ist, wurde es einer detaillierten Analyse

unterworfen.

Um nach O-spezifischen Seitenketten im gereinigten LPS zu suchen, wurde es mit 1 %iger Essigsäure bei 100°C gespalten, Lipid A abzentrifugiert und das Polysaccharid auf einer Sephadex G-50 Säule chromatographiert. Wie bei S-Lipopolysacchariden zu erwarten wurden drei Fraktionen eluiert, von denen die erste Fraktion O-spezifische Seitenketten, die zweite core-Oligosaccharid und die dritte KDO enthalten konnte (Abb. 5). Die ersten zwei Fraktionen wurden zu Monosacchariden hydrolysiert (0.5 N HCl bei 100°C, 20 Stunden), und für die gaschromatographische Analyse derivatisiert (Tabelle 11).

Tabelle 11

Zuckersusammensetzung der Fraktionen

	1. Fraktion	2. Fraktion
	%	%
Gal	14,97	0
Glc	65,27	50
Hep	4,88	116,8
GlcN	21,69	7,6
Man	0	14,5

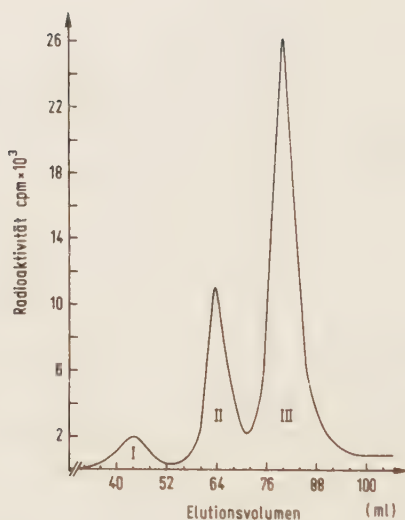


Abb. 5 Elutionsprofil des degradierten Polysaccharides aus dem LPS von *E. cloacae*.

Saule: Sephadex G-50 ($V_o = 34\text{ml}$; $V_i = 80\text{ml}$)

Elutionsmittel: 0,1M Pyridin-Acetat-Puffer pH 5,0

Die Radioaktivität der Fraktionen wurde von 0,1ml Aliquots nach Zugabe von 5ml Szintillatorflüssigkeit (Rotizent. Roth) im Kontron-Counter bestimmt.

Die erste Fraktion besitzt nur 4.9% Heptose und große Mengen an Galactose, Glucose und Glucosamin und scheint deshalb ein O-spezifisches Polysaccharid zu enthalten; die zweite enthält Zucker in einem Verhältnis, das typisch für core-Oligosaccharide ist.

4.1.3.3 Lipopolysaccharid von *Erwinia carotovora*.

Im Gegensatz zu LPS von *E. cloacae* läßt sich das Lipopolysaccharid von *Erwinia carotovora* in guter Ausbeute (1,8% des bakteriellen Trockengewichts) extrahieren. Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tsai & Frasch, 1982) wurde festgestellt, daß sein Wanderungsmuster dem von LPS aus R-Stämmen ähnlich war (Abb. 6). Damit ist bestätigt, daß LPS von *Erwinia* ausschließlich aus core-Oligosaccharid gebildet ist. Wegen seiner einfachen Struktur wurde das LPS von *Erwinia* für eine Strukturanalyse ausgewählt.

Die Struktur des Lipopolysaccharids wurde nach folgender Strategie aufgeklärt:

Das core-Oligosaccharid wurde durch Hydrolyse mit 1 %iger Essigsäure (20 min bei 100°C) von Lipid A abgespalten. Das unlösliche Lipid A wurde abzentrifugiert und der Überstand durch Gelfiltration auf Sephadex G 50 (1x80 cm) mit 0,1 M Pyridin/Acetat pH 5.5 als Laufpuffer eluiert. Die kohlenhydrathaltigen Fraktionen wurden mit dem Phenol-Schwefelsäure-Test identifiziert. Das core-Oligosaccharid eluiert in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 1200 D.

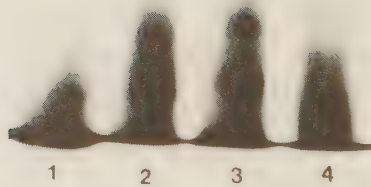


Abb. 6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Lipopolysaccharides aus:

1. *E.coli* K12
2. *Proteus vulgaris*
3. *Serratia marcescens*
4. *Erwinia carotovora*

0,1 ml von einer LPS-Lösung (2mg/ml) wurde mit dem gleichen Volumen einer Puffer-Lösung (0,1M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% Sucrose, 1% Mercaptoäthanol und 0,001% Bromphenolblau) gemischt und 3min bei 100°C erhitzt. 10µl wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. (10mA, 16h). LPS wurde nach der Silberfärbung Methode angefärbt (Tsai & Frasch, 1982).

Die quantitative gaschromatographische Analyse zeigte, daß Glucose und Heptose in einem molaren Verhältnis von 1:1 vorliegen (9,6% Glucose und 10,3% Heptose). Das lyophylierte Oligosaccharid wurde dephosphoryliert, methyliert und einer kombinierten gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse unterworfen.

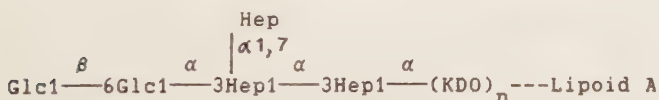
Aus den molaren Verhältnissen der partiell methylierten Alditolacetate (Abb. 7) wurde festgestellt, daß das methylierte Oligosaccharid nicht homogen ist, sondern aus einer Mischung von drei Oligosacchariden besteht:

32% Oligosaccharid mit zwei Glucosen und drei Heptosen.

33% Oligosaccharid mit einer Glucose und drei Heptosen und

35% Oligosaccharid mit zwei Glucosen und zwei Heptosen.

Das Verhältnis von Glucose zu Heptose (2,5:3) in dieser Mischung stimmt mit dem aus der quantitativen Analyse des Oligosaccharids überein. Aus den erhaltenen Daten läßt sich folgende Struktur ableiten:



Die anomere Konfiguration der glycosidischen Bindung wurde durch CrO_3 -Oxidation (Hoffmann et. al. 1972) bestimmt. Die quantitative Analyse des oxidierten Oligosaccharids zeigte nach der Oxidation, daß die Hälfte der Glucose zerstört ist, während die Heptose erhalten bleibt. Das bedeutet, daß eine Glucose-Einheit in α -Konfiguration und die andere in β -Konfiguration vorliegt, während alle Heptosen in α -Konfiguration vorliegen.

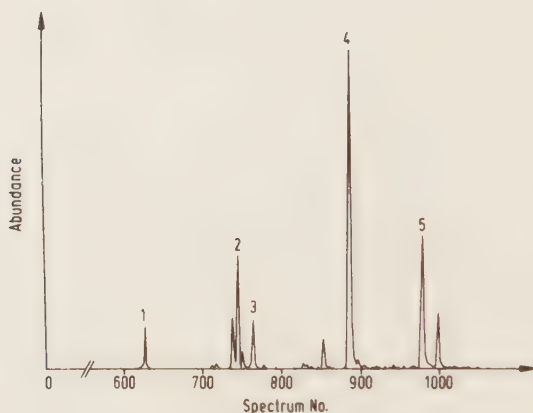


Abb.7 Methylierungsanalyse des core-Oligosaccharides aus *Erwinia carotovora*.

Die partiell methylierten Alditolacetate wurden mit dem kombinierten Gaschromatograph-Massenspektrometer analysiert; Carlo Erba 2101, Varian CH7A/SS188-System

Säule (25m x 0,32mm) belegt mit Methyl-Phenyl-Silicone (Chromopack CP Sil 8)

Säulentemperatur: 100°C

Heizprogramm auf 240°C mit 3°C/min

Trägergas: Helium 1,8ml/min

1	2,3,4,6-Tetra-O-methyl-1,6-di-O-acetyl-glucitol	1
2	2,3,4-Tri-O-methyl-1,5,6-tri-O-acetyl-glucitol	0,67
3	2,3,4,6,7-Tetra-O-me-di-O-acetyl-heptitol	1,0
4	2,4,6,7-Tetra-O-methyl-1,3,7-tri-O-acetyl-heptitol	1,52
5	2,4,6-Tri-O-methyl-1,3,5,7-tetra-O-acetyl-heptitol	1,0

Die Konfiguration der Glucose-Einheiten wurde mit Hilfe von LPS aus einer Mu G(-)-resistenten Mutante (*E. carotovora* B374, 7.1) genauer bestimmt. Die Zuckeranalyse dieses Lipopolysaccharides zeigt, daß eine Glucose fehlt (9 % Glucose und 21,6 % Heptose). Da das Verhältnis von Glucose zu Heptose nach Oxidation mit CrO_3 erhalten bleibt, muß Glucose hier in einer α 1-3 glycosidischen Bindung vorliegen. Daraus folgt unmittelbar, daß die endständige Glucose im Wildtyp-LPS β 1-6 gebunden sein muß. Diese Struktur ist dem LPS von *E. coli* B ähnlich (Prehm, et al., 1975). Sie unterscheiden sich im Hexoseteil lediglich in der endständigen glycosidischen Bindung: β 1-6 bei *Erwinia* und α 1-3 bei *E. coli* B.

Das defekte LPS hat keine inaktivierende Wirkung auf Mu G(-)-Phagen. Für deren Adsorption wird also die endständige β 1-6 Glucose benötigt.

4.1.3.4 Hemmung der Adsorption durch Kohlenhydrate.

Verschiedene Mono- und Disaccharide wurden daraufhin untersucht, ob sie die Phagenadsorption an *Erwinia carotovora* hemmen können (Abb. 8). Im Vergleich zu den anderen Kohlenhydraten konnte Gentiobiose in niedrigster Konzentration die Phagenadsorption am besten hemmen. Gentiobiose hat die gleiche Konfiguration wie der Phagenrezeptor. Dies bestätigt noch einmal die entscheidende Rolle der β 1-6 gebundene Glucose für die Phagenadsorption.

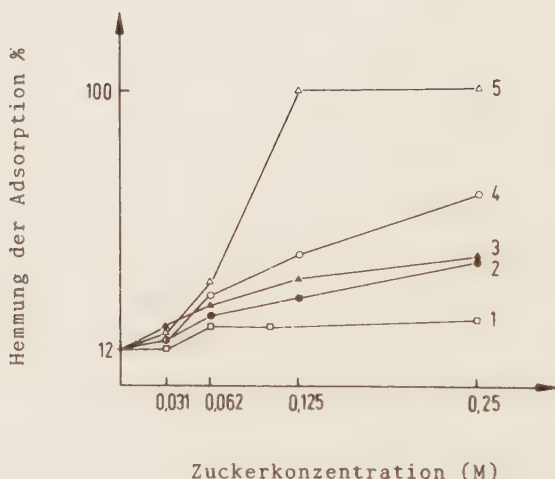


Abb. 8 Hemmung der Mu G(-)-Adsorption an *Erwinia carotovora* durch Zucker

- 1 α -O-Methylgalactose
- 2 β -O-Methylglucose
- 3 α -O-Methylglucose
- 4 Isomaltose
- 5 Gentiobiose

5ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und in 0.5ml TM-Puffer resuspendiert. Zu 0.1ml von dieser Suspension wurden 0.1ml Phagenlysat (10^5 PFU/ml) und 0.1ml Zuckerlösung in steigender Konzentration gegeben.

4.1.4 Die Rezeptorstruktur der Mu G(-) hr-Mutante

Verschiedene *E.coli* Stämme wurden auf ihre Sensitivität gegen Mu G(-)-Phagen getestet. Dabei wurde festgestellt, daß der Phage mit einer Frequenz von 10^{-7} auf *E.coli* C plattiert, was mit anderen Befunden übereinstimmt (van de Putte et al, 1980). Da *E.coli* C kein Restriktionssystem besitzt, läßt die niedrige Plattierungseffizienz daher erwarten, daß nur eine "host range" Mutante von Mu G(-) auf diesem Stamm wächst. Im Inaktivierungsexperiment zeigte sich, daß der Phage Mu G(-)h vom *E.coli* C-LPS nicht aber vom *E.cloacae*-LPS inaktiviert wird (Tabelle 12).

Tabelle 12

Die Sensitivität von *E.cloacae* und *E.coli* C

gegen Mu G(-)-Phagen

Phage	E.O.P		Inaktivierung durch LPS (% von überlebenden Phagen)	
	<i>E.cloacae</i>	<i>E.coli</i> C	<i>E.cloacae</i>	<i>E.coli</i> C
Mu G(-)	1	3×10^{-6}	0,7	100
Mu G(-)h101	5×10^{-5}	1	26	0,3

Für die Untersuchung des Rezeptors der Mu G(-) h-Mutante wurden phagenresistente Mutanten von *E.coli* C isoliert. Ihr LPS wurde gaschromatographisch analysiert und mit der bereits bekannten Struktur des Wildtyp-Lipopolysaccharides

verglichen (Feige & Stirm, 1976; Jansson et al., 1981). Drei Gruppen von core-Mutanten wurden gefunden: Mutanten, bei denen die terminale Glucose fehlt, Mutanten, die nur Heptose enthalten und Mutanten mit einem kompletten LPS-core (Tabelle 13).

Tabelle 13

LPS-Struktur von *E.coli* C-Mutanten

Stamm	molares Verhältnis *			vorgeschlagene Struktur
	Gal	Glc	Hep	
Wildtyp	2	3,2	2,8	$ \begin{array}{ccccccc} & & \alpha 1,2 & & & & \\ \text{Gal} & \text{---} & \text{Gal} & & & & \\ & & & \alpha 1,2 & & & \\ & \beta 1,3 & \text{Glc} & \text{---} & \text{Glc} & \text{---} & \text{Glc} & \text{---} & \text{Hep} & \text{---} & \text{Hep} \\ & & & \alpha 1,3 & & \alpha 1,3 & & \alpha 1,3 & & \\ & & & & & & & & 1,7 & \\ & & & & & & & \text{Hep} & & \end{array} $
Mu ^r #12	2	2,1	2,3	$ \begin{array}{ccccccc} & & \alpha 1,2 & & & & \\ \text{Gal} & \text{---} & \text{Gal} & & & & \\ & & & \alpha 1,2 & & & \\ & & \alpha 1,3 & & \alpha 1,3 & & \alpha 1,3 & & \\ & & \text{Glc} & \text{---} & \text{Glc} & \text{---} & \text{Hep} & \text{---} & \text{Hep} \end{array} $
Mu ^r #3	0	0	2	$ \begin{array}{ccc} & \alpha 1,3 & \\ & \text{Hep} & \text{---} & \text{Hep} \end{array} $

* Das molare Verhältnis der Zucker bezieht sich auf die Glucosamin-Einheiten des Lipids A.

Das LPS der ersten Gruppe von Mutanten, konnte die Phagen nicht inaktivieren. Die letzte Glucose in einer β 1-3 glycosidischen Bindung scheint an der Adsorption von Mu G(-)h beteiligt zu sein. Die anomere Konfiguration der Glucose spielt dabei eine Hauptrolle; ein Beweis dafür ist die Unfähigkeit des Phagen eine in α Konfiguration 1-3 gebundene Glucose zu erkennen, da *E.coli* B-LPS mit einer

solchen endständigen Glucose den Phagen nicht inaktiviert.

Die phagenresistenten Mutanten ohne Defekt in der LPS-Struktur inaktivieren den Mu G(-)h Phagen. Bei diesen Mutanten sind offensichtlich Faktoren verändert, die sich auf das Phagenwachstum auswirken. Sie wurden gom (growth of Mu) Mutanten genannt.

Die *E. coli* C-Rezeptormutanten wurden auf ihre Sensitivität gegen P1-, P7- und D108-Phagen getestet. Die Stämme konnten von keinem dieser Phagen infiziert werden.

4.1.5 Charakterisierung des Rezeptors von P1

Die Tatsache, daß P1 ein zum Mu G-Segment homologes invertierbares Element enthält, führt zu der Frage, ob dieses durch Inversion auch den Wirtsbereich des Phagen kontrolliert. Durch Insertion des Tn5 Transposons in *gin* wurde ein *gin*-defekter P1-Phage konstruiert (Ritthaler, Kahmann & Kamp in Vorbereitung), dessen G-Segment dadurch in der einen oder anderen Orientierung fixiert ist. Mit ihm konnte der Einfluß der G-Inversion auf die Wirtsspezifität untersucht werden: Phagen mit dem G-Segment in der (+) Orientierung infizieren alle Stämme, die auch vom Wildtyp-P1 als Wirt erkannt werden, während P1 G(-)-Partikel auf diesen Stämmen nicht wachsen.

Da der P1 G(-)-Phage mit der Tn5-Insertion das Kanamycin-resistenz-Gen (*kan^r*) trägt, wurde seine Penetration in die Zellen auf die *kan*-Resistenz der infizierten Zellen getestet. Auf diese Weise wurden zwei *kan*-resistente Stämme, von *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae*, gefunden.

Die *km*-resistenten Kolonien waren jedoch nicht temperatur-sensitiv, konnten also keine Phagen produzieren. Dies widerspricht dem fruheren Befund, daß *km*-resistente Stämme immer auch lysogen waren. (Goldberg et al., 1974; Murooka & Harada 1979) Andererseits wurden bei *Myxococcus xanthus* *km^F*-Transduktanten gefunden, die ebenfalls nicht lysogen waren (Kuner & Kaiser, 1981).

Die *km*-Resistenz und nicht Lysogenie von *E. cloacae* und *Klebsiella* muß daher kommen, daß P1 G(-)-Phagen zwar in die Bakterien eindringen, sich aber auf diesen nicht entwickeln können.

4.1.5.1 Die Affinität des Phagen P1 G(-) für LPS

Da aus vielleicht anderen Gründen P1 G(-) Phagen auf *E. cloacae* keine Plaques machten, mußte die Anwesenheit des Rezeptors durch den LPS-Bindungstest indirekt geprüft werden. Die Anwesenheit von P1 G(-) Phagen im überschuß konnte die Mu G(-) Inaktivierung durch *E. cloacae* -LPS nicht hemmen (Abb. 9).

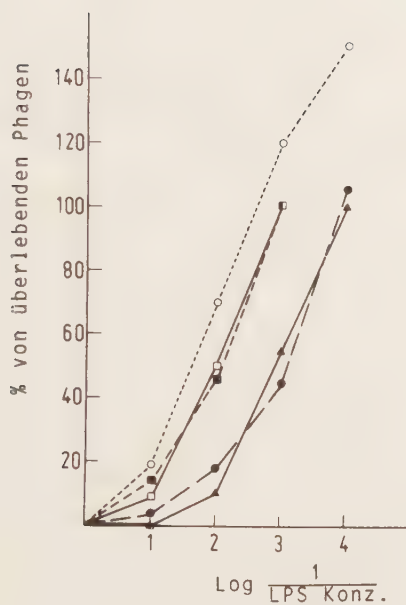


Abb. 9 Affinität des P1 G(-)-Phagen für LPS

Inaktivierung von Mu G(-) durch *E. cloacae* LPS in Gegenwart von P1 G(-) (■) und in dessen Abwesenheit (□).

Inaktivierung von P1 G(+) durch *E. coli* C LPS in Gegenwart von P1 G(-) (●) bzw. von Mu G(-)h (○) und in Abwesenheit des hemmenden Phagen (▲).

Das Experiment wurde mit gleichen Volumen von Phagen und LPS durchgeführt: in Abwesenheit des hemmenden Phagen wurde TM Puffer hinzugefügt.

E. cloacae LPS hat also keinen Rezeptor für den Phagen P1 G(-), was man wegen der Homologie der G-Segmente von Mu und P1 erwartet hätte. Die Ausprägung von k_{mf} in *E. cloacae* kann nur durch unspezifische Adsorption von P1 G(-) erfolgt sein.

Das gleiche Experiment wurde mit LPS von *E. coli* C in Konkurrenz mit P1 G(+)-Phagen durchgeführt. Wieder wurde keine Beeinflussung der P1 G(+) Inaktivierung durch *E. coli* C-LPS vom P1 G(-)-Phagen festgestellt.

4.1.5.2 Charakterisierung des Rezeptors von P1 G(+).

Die bisherigen Befunde über die Wechselwirkung von Phagen und Wirt beruhen auf der Messung der Phagenadsorption an den Zellen und nicht auf der Auswertung der Phageninaktivierung durch LPS. (Lindberg, 1973, 1977; Rapin & Kalker, 1971) Um den Rezeptor für P1-Wildtyp bzw. für P1 G(+) auf dem LPS Molekül zu lokalisieren, wurde LPS mit verschiedenen "core"-Typen von sensitiven Stämmen auf Phageninaktivierung getestet. Das aktive LPS enthält eine endständige 1-2 oder 1-3 glycosidisch gebundene Glucose, die in α oder β Konfiguration vorliegt (Abb. 10).

Strain	core type	LPS	Binding to P1 G(-) phage
Salmonella arizonae (R _a)	GlcNAc $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Gal $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,6$		+
E. coli C (R ₁)	Gal $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Gal $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,3$ Glc		+
E. coli O100 (R ₂)	GlcNAc $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,6$		+
E. coli O111 (R ₃)	Glc $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Gal $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,3$ GlcNAc		+
E. coli O14 (R ₄)	Gal $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Gal $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,4$ Gal		—
E. coli K12 C600	GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1,6}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,6$		+
E. coli B	Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep —		+
E. coli K12 mutants*			
group I	Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,6$		+
II	Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep —		+
III	Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,6$		—
IV	Hep —		—
E. coli C mutants*			
group I	Gal $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Gal $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep —		—
II	Gal $\xrightarrow{\alpha 1,2}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep — Gal $\alpha 1,3$ Glc		+
III	Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Glc $\xrightarrow{\alpha 1,3}$ Hep —		+
IV	Hep —		—

Abb. 10 Bindung des Phagen P1 G(+) an LPS
E.coli K12-Mutanten sind gegen Mu resistent, E.coli C-Mutanten der Gruppen II und IV gegen Mu G(-)h; die anderen E.coli C-Mutanten gegen ϕ X 174. (Freiburg Sammlung).
-) ID₅₀ >5mg/ml LPS; (+) ID₅₀ 0,5mg/ml LPS; (+) ID₅₀ <0,0025mg/ml LPS

Ein anderer Typ von glycosidischer Bindung, Glc β 1-6Glc, die am nichtreduzierenden Ende des Lipopolysaccharides aus *Erwinia* vorkommt, wurde nicht von den Phagen erkannt.

P1 G(+) besaß eine zweihundertfach geringere Affinität für das *Salmonella arizonae*-LPS (Ra core-Typ), was andeutete, daß die α 1-2 endständige Acetylglucosamine nicht ganz der Rezeptorstruktur entspricht. Ornellas und Stocker (1974) fanden schon früher ein ähnliches Ergebnis. Sie zeigten, daß P1-Wildtyp auf *Salmonella* R-Mutanten mit komplettem LPS-core mit niedriger Effizienz plattiert; der Phage plattiert dagegen auf R-Stämmen mit einem defekten LPS, das eine 1-3 endständige Glucose besitzt, mit der gleichen Effizienz, wie auf sensitiven Stämmen.

Die Annahme, daß der Phage P1 auch eine interne 1-3 gebundene Glucose erkennen kann (Lindberg, 1977) stimmt mit hier beschriebenen Ergebnissen nicht überein. *E.coli* K12- und *E.coli* C-Mutanten, die solche Glucose in ihrem LPS enthalten, sind gegen P1 G(+) bzw. P1-Wildtyp resistent. Dadurch, daß P1 eine terminale 1-2 oder 1-3 gebundene Glucose als Rezeptor erkennt, ist sein Wirtsbereich breiter als der von Mu. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß das invertierbare G-Segment auch in P1 den Wirtsbereich kontrolliert.

Auf Grund der Homologie zwischen den G-Segmenten und der überlappenden Wirtsbereiche konnte der P1-Wirtsbereich durch Kreuzung auf Mu übertragen werden (Toussaint et al., 1978). MuhP1-Hybride wurden durch Kreuzung der G-Segmente erhalten und auf ihren Wirtsbereich hin untersucht.

4.1.6 Konstruktion des MuhP1-Hybrids und Charakterisierung seines Wirtsbereiches

Zur Konstruktion der Hybride wurde der Phage Mu cits62 *gin*⁻ 445-5 G(+) mit dem Plasmid pGP1, das die *gin*-Funktion und das G-Segment des Phagen P1 enthält, gekreuzt. Dazu wurde der Plasmidstamm DK2086 mit Mu *gin*⁻ 445-5 G(+) infiziert und anschließend lysogene Kolonien isoliert. Aus diesen Kolonien wurden Minilysate präpariert, die auf *E.coli* S1652, einem Wirt für P1, auf Plaquebildung getestet wurden. Dies stellt eine Selektion auf den P1-Wirtsbereich in G(+) Orientierung dar. Zur Reinigung vom Plasmid wurden aus klaren Plaques erneut Lysate hergestellt, mit denen CSH50 lysogenisiert wurde. Auf diese Weise wurden 20 Hybride erhalten.

Die Phagenhybride plattierten auf Stämme, wie CSH50, *E.coli* C, S1652, mit gleicher Effizienz wie P1-Phagen (Tabelle 14).

Tabelle 14

Die Sensitivität der Stämme gegen MuhP1-Hybrid

Phage	E.coli K12		S1652		E.coli C	
	a	b	a	b	a	b
Mu G(+)	1	0,3	10^{-9}	100	10^{-9}	100
P1 G(+)	1	0	1	0	1	0
MuhP1h	10^{-1}	40	1	0,2	1	0

a) E.O.P.

b) Inaktivierung durch LPS (% von Überlebenden Phagen)

Im Gegensatz zu Mu und P1 erkennt MuhP1 das *E.coli* K12-LPS nicht, wird aber von *E.coli* C- oder S1652-LPS eben so gut inaktiviert wie P1. Offensichtlich hat der Phage Mu durch die Kreuzung denjenigen Teil des P1 G(+) Segments übernommen, der der LPS-Bindungsstelle entspricht.

4.2 UNTERSUCHUNG DER SCHWANZFASERN VON MU

Die Orientierung des invertierbaren G-Segments (G (+) oder G(-)) bestimmt die Rezeptorspezifität der Phagenpartikel. Die Produkte, der durch diese Inversion abwechselnd exprimierten Gene, müssen an der Schwanzfaserbiosynthese beteiligt sein.

Wie aus bisherigen Sequenzdaten bereits bekannt ist (Kahmann & Kamp, in Vorbereitung), unterscheiden sich diese Gene im variablen Teil, was auch zu einer unterschiedlichen Struktur auf Proteinebene führt und möglicherweise auch die Morphologie der Schwanzfasern verändert.

4.2.1 Morphologie der Mu-Phagen

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des gereinigten Phagen Mu G(+) und Mu G(-) zeigen denselben Aufbau aus Kopf (Durchmesser 61nm), Schwanz (Länge 100nm) und Schwanzfasern (Länge 31nm), der für die Phagen der Bradleys Gruppe A typisch ist (Abb. 11).

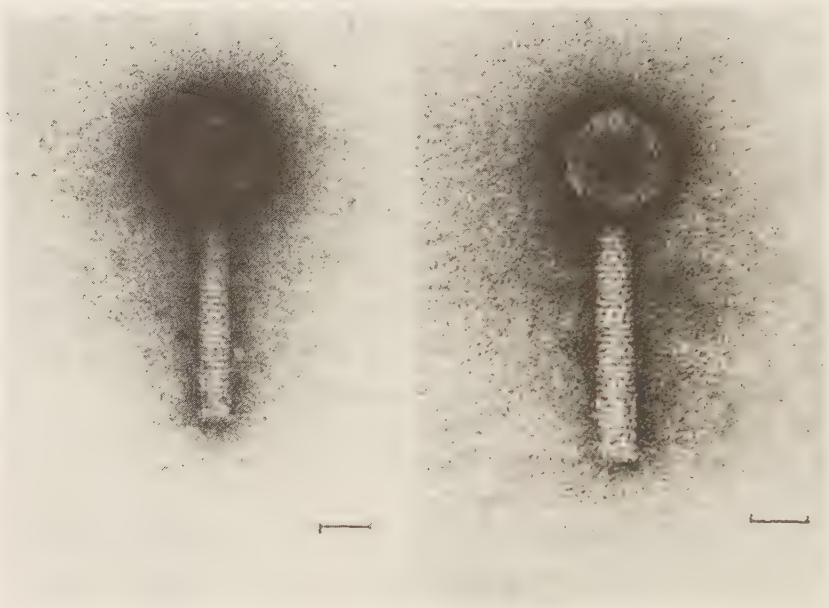


Abb. 11 Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriophagen Mu (M. Claviez).
(Negativ-Kontrastierung mit 1% Uranylacetat, 330000 Vergrößerung). Links Mu G(-), rechts Mu G(+). Markierung 250Å.

Keine Basalplatten-Struktur war sichtbar. Im Mittel waren drei Schwanzfasern pro Phage erkennbar. Zwischen den Schwanzfasern der beiden Phagentypen konnte kein morphologischer Unterschied festgestellt werden. Die Größe der verschiedenen Phagenstrukturen befindet sich mit früheren Daten in Übereinstimmung (Grundy & Howe 1984; Toussaint & Resibois, 1982).

4.2.2 Antigene Eigenschaften von Mu G(+)- und Mu G(-)-Phagen

Die meisten Phagen besitzen verschiedene Arten von Antigenen: Antigene, die auf den Kopfproteinen lokalisiert sind, aktivieren das Komplementsystem, während die Antigene auf Schwanz und Schwanzfasern zur Bildung neutralisierenden Antikörper führen (Adams, 1959).

Zur Herstellung neutralisierender Antikörper gegen die Schwanzfasern wurden gereinigte Mu G(+) bzw. Mu G(-) Phagen benutzt. Je zwei Antiseren für jeden Phagen wurden auf unterschiedliche Reaktion mit Mu G(+) und G(-) Phagen getestet.

Bei der Reaktion mit den homologen Phagen zeigten die Anti Mu G(+) Antiseren den ID_{50} Wert entsprechend einer Serumverdünnung von 1/11000. Bei Mu G(-) Phagen konnten dieselben Seren erst bei einer Verdünnung von 1/1100 die Hälfte der Phagen neutralisieren. Das Verhältnis $ID_{50} G(+)/ID_{50} G(-)$ von 10:1 zeigte, daß diese Antikörper in erster Linie spezifisch gegen Mu G(+) Phagen gerichtet sind.

Die Mu G(-) Antiseren wurden in derselben Weise getestet. Bei beiden Seren beträgt das Verhältnis $ID_{50} G(-)/ID_{50} G(+)$

10:1, was zu einer analogen Schlußfolgerung führt. Die Kreuzaktivität läßt sich dadurch erklären, daß diese Antiseren Antikörper enthalten, die gegen den konstanten Teil der Schwanzfaser oder aber gegen den Schwanz selbst gerichtet sind.

Wie bereits erwähnt, kodiert das G-Segment für vier Proteine, von denen in jeder Orientierung zwei (S, U in G(+), S', U' in G(-)) exprimiert wurden. Beide Proteine müssen an der Schwanzfaserbiosynthese beteiligt sein; jedoch ist es bisher nicht bekannt, welche der Proteine die antigenen Determinanten besitzt. Ambermutanten des Wildtyps in S und U wurden durch sogenannten "Serum blocking assay" (Buchwald & Siminovitch, 1969) auf ihre Fähigkeit, die Neutralisierungsaktivität des Serums zu blockieren untersucht.

Während die S am- Mutante nur auf *E. cloacae* wachsen kann (EOP = 1; S'-Gen in G(-)-Orientierung ist intakt), kann die U am-Mutante sowohl auf *E. cloacae* als auch, wenn auch mit niedriger Effizienz auf *E. coli* K12 (10^{-5}) wachsen. Die Ergebnisse (Tabelle 15) zeigen, daß die Phagenmutanten die Mu G(+)-spezifischen Antikörper nicht binden und deshalb die Neutralisierungsreaktion nicht beeinflussen können.

Tabelle 15

Inaktivierung von Mu G(+)
in Anwesenheit der S am bzw. U am Mutante *

		% überlebende Phagen
Mu G(+) + G(+) Antiserum		50
+ U am	10^{-1}	37
	10^{-2}	32
	10^{-3}	42
	10^{-4}	50
+ S am	10^{-1}	12
	10^{-2}	35
	10^{-3}	50
	10^{-4}	50

* 0,1ml Serum (Verdünnung entsprechend dem ID_{50} Wert) wurden mit 0,1ml Mu G(+) (10^3 PFU/ml) und mit 0,1ml des S am- bzw. U am- Lysates (Titer auf *E. cloacae* 10^8 PFU/ml) inkubiert (37°C, 1h) und anschließend die Mischung mit 0,1ml Indikatorkultur plattiert.

Man kann daher annehmen, daß sowohl S als auch U für die Bildung der Schwanzfaser verantwortlich sind. Dies wurde auch durch elektronenmikroskopische Analyse von S- und U-defekten Phagen bewiesen, die keine Schwanzfaser mehr besaßen (Grundy & Howe, 1984).

Trotz der Homologie zwischen den G-Segmenten von Mu und P1 erkennt der Phage P1 zumindest in G(+)-Orientierung, eine große Anzahl von Rezeptorstrukturen. Offensichtlich unterscheiden sich die beiden Phagen in ihren LPS-Bindungsstellen. Befindet sich die Antikörper-Bindungsstelle außerhalb der Rezeptor-Erkennungsstelle, so sollten die Phagen durch das Serum gleich stark inaktiviert werden. Fallen die antigenen Determinanten jedoch mit der LPS-Bindungsstelle teilweise oder ganz zusammen, sollten die Phagen mit den Seren unterschiedlich reagieren.

Um die Antikörper-Bindungsstelle im G-Segment lokalisieren zu können, wurden Mu G(+)- und G(-)-Antiseren auf ihre Fähigkeit zur Neutralisierung von P1 G(+)-Phagen untersucht. Als Indikatorstamm wurde *E.coli* C verwendet. Erwartungsgemäß wird P1 nur von G(+)-Seren inaktiviert, wenn auch mit geringerer Effizienz als Mu. Der ID_{50} Wert bei einer Serumverdünnung von 1/4000 (Abb. 12) spricht dafür, daß sich die Antikörper-Bindungsstellen auf den Schwanzfasern von Mu und P1 zwar strukturell unterscheiden, daß zwischen ihnen jedoch genug Ähnlichkeit vorhanden ist, so daß die Anti Mu G(+) Antikörper mit P1 kreuzreagieren können.

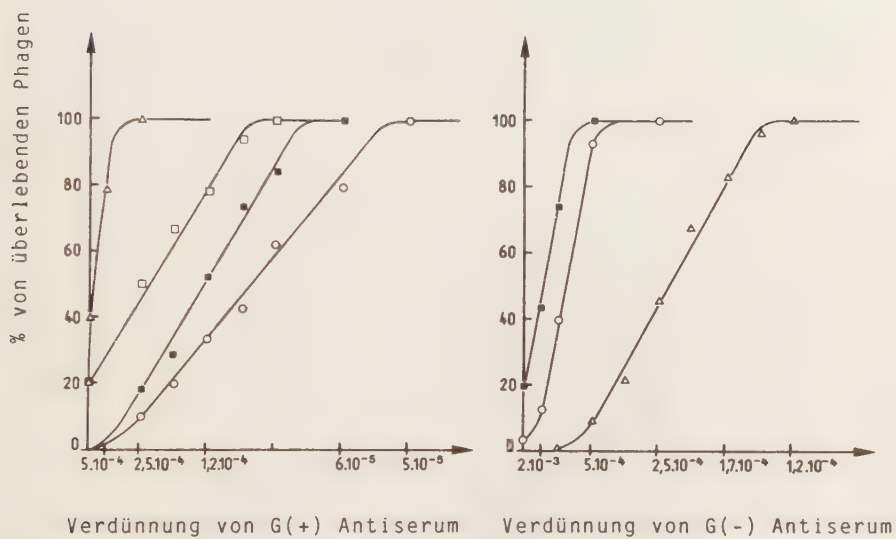


Abb. 12 Inaktivierung von verschiedenen Phagen durch Mu Antiseren

Mu G(-) Δ
 P1 Wildtyp $\square$
 MuhP1-Hybrid $\blacksquare$
 Mu G(+) $\circ$

Ob auch P1 G(-) Antigene besitzt, die von den Anti G(-) Antikörper neutralisiert werden können, konnte durch "Serum blocking assay" nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich Mu und das MuhP1-Hybrid in ihren Wirtsbereich und erwartungsgemäß in ihrer Rezeptor-Bindungsstelle. Der ID_{50} Wert bei der Inaktivierung des MuhP1-Hybrids mit Anti Mu G(+) Antiseren weist auf mit Mu gemeinsame Determinanten hin, die sich jedoch im konstanten Teil des Schwanzfaserproteins und/oder im Schwanz selbst befinden. Diese Resultate führen zu der Schlußfolgerung, daß die Antikörper-Bindungsstelle auch im G-Segment kartiert und mit der LPS-Bindungsstelle überlappt. Solche Überlappung wurde auch bei T-Phagen gefunden, die gleiche Strukturen auf OmpA-Protein erkennen (Schwarz et al., 1983).

4.2.3 Untersuchung der Schwanzfasergene

Um die Wechselwirkung zwischen den Genprodukten des G-Segments, die anscheinend die Schwanzfasern bilden, und der bakteriellen Zellwand genauer zu untersuchen, wurden MuhP1-Phagenhybride und Wirtsbereichsmutanten von Mu (Mu G(-)h101 und Mu pAp1) auf DNA-Ebene analysiert.

4.2.3.1 Analyse der MuhP1-Hybride

Zur Analyse der G-Segment-Orientierung wurden die 20 Hybride mit dem KpnI Restriktionsenzym untersucht. Es war bekannt, daß sich eine KpnI-Schnittstelle im G-Segment von Mu, kurz vor dem Ende des S-Gens befindet, während im G-Segment von P1 keine solche Stelle existiert (Kamp et al.,

1978: Bächli & Arber, 1977). Auch in den MuhP1-Hybriden tritt keine KpnI-Schnittstelle auf, so daß die Kreuzung der beiden G-Segmente vor der Erkennungssequenz von KpnI in Mu stattgefunden haben muß (Abb. 13). Restriktionsverdau mit anderen Enzymen (HpaII, BalI + HindIII und RsaI) zeigten bei den MuhP1-Hybriden mit Mu G(+) vergleichbare Muster (Abb. 14), daher sollte das rekombinierte G-Segment ebenfalls in (+)-Orientierung vorliegen.

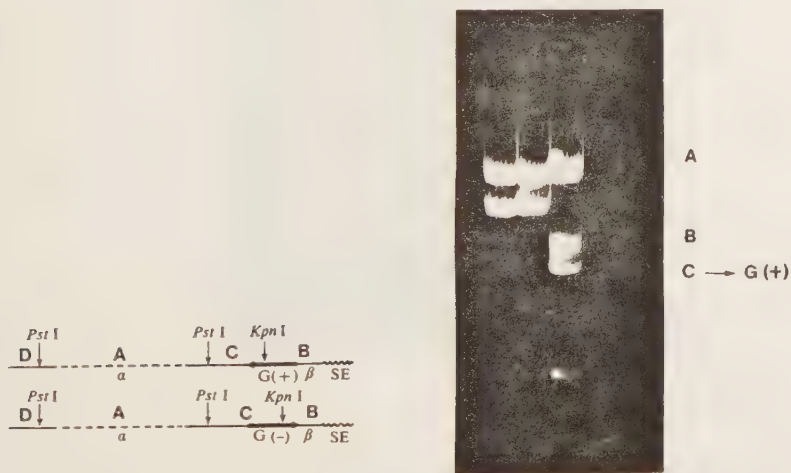


Abb. 13 Bandenmuster von MuhP1-Hybriden (#1, #10) bzw. von Mu G(+) verdaut mit Kpn I + Pst I (1,2% Agarose, 75mλ, 4h). Die Bezeichnung der Fragmente folgte wie in der Restriktionskarte. Im Fall des Phagen Mu G(-) sind die Fragmente C und B nicht getrennt.

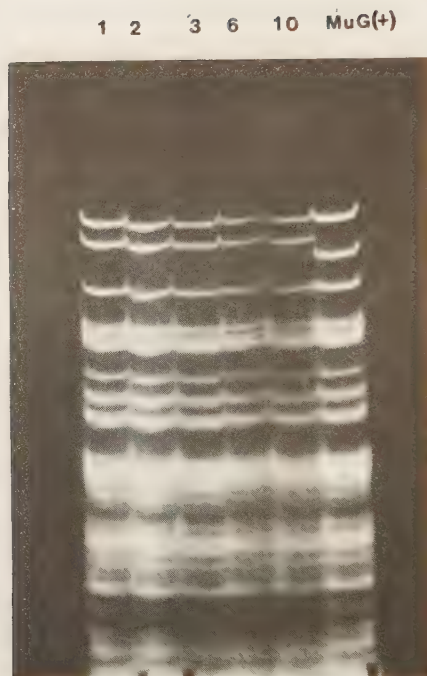


Abb. 14 Bandenmuster von MuhP1-Hybriden (#1, #2, #3, #6, #10) bzw. von Mu G(+) verdaut mit Hpa II (2% Agarose, 75mA, 4h)

Um das G-Segment in diesen Hybriden zu invertieren und damit den Einfluß der G(-)-Orientierung auf deren Wirtsbereich zu ermitteln, wurde das Hybrid MuhP1 #10 mit einem *gin*-Donor-System komplementiert (λ Mu *gin*⁺). In der Plattierungseffizienz konnten die beiden Hybride (vor und nach *gin*-Komplementierung) nicht unterschieden werden. Auf CSH50, *E. coli* C, S1652 plattierten beide ebenso gut wie P1 und auf *E. cloacae* bildeten sie keine Plaques, sodaß daraus keine Information über den Einfluß der G-Inversion erhalten werden konnte. Um überhaupt eine Inversion nachweisen zu können, wurde aus dem komplementierten Hybrid-DNA präpariert und mit verschiedenen Enzymen analysiert. Der Restriktionsverdau mit HindII zeigte eine Mischung von beiden Orientierungen. (Abb. 15)

Daß das MuhP1-Hybrid in G(-)-Orientierung auf *E. cloacae* keine Plaques bildete, könnte darauf zurückzuführen sein, daß durch Kreuzung eine Mu G(-) defekte Schwanzfaser entstand oder daß der in Mu gekreuzte Teil des P1-G-Segments nicht mehr die Eigenschaften besitzt, die für eine Infektion von *E. cloacae* nötig sind.



Abb. 15 Inversion des G-Segments im MuhP1-Hybrid.
Hind II Fragmente im Phagen Mu G(+) (3) bzw. im MuhP1-Hybrid vor (1) und nach dessen Komplementierung mit einem *gin*-Donor-System (2). Die angekreuzten Banden sind charakteristisch für G(-)-Orientierung.

4.2.3.2 Sequenzierung des MuhP1 Hybrides

Um das "crossover" im G-Segment lokalisieren zu können, wurde das MuhP1-Hybrid im Bereich des Hybrid-Gens S und über dessen Ende hinaus sequenziert. Zur Sequenzierung wurden Enzyme gewählt, die in MuhP1 und Mu G(+) vergleichbare Muster zeigten (Abb. 16, 17)

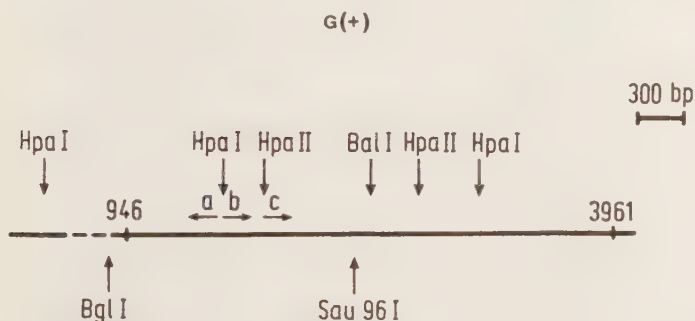


Abb. 16 Sequenzierungsstrategie im G-Segment des MuhP1-Hybrides

Zwei HpaI-Fragmente wurden nach 5'-Endmarkierung und Trennung auf 1,2% Agarose (75mA, 4h) elektroeluiert. Fragment a (ca. 3000 bp) wurde mit BglI, und Fragment b (ca. 1600 bp) mit BalI nachverdaut. Das HpaII-Fragment (c) wurde nach Elektroelution (2% Agarose) mit Sau 96I verdaut. Die Pfeile zeigen die Richtung der Sequenzierung.

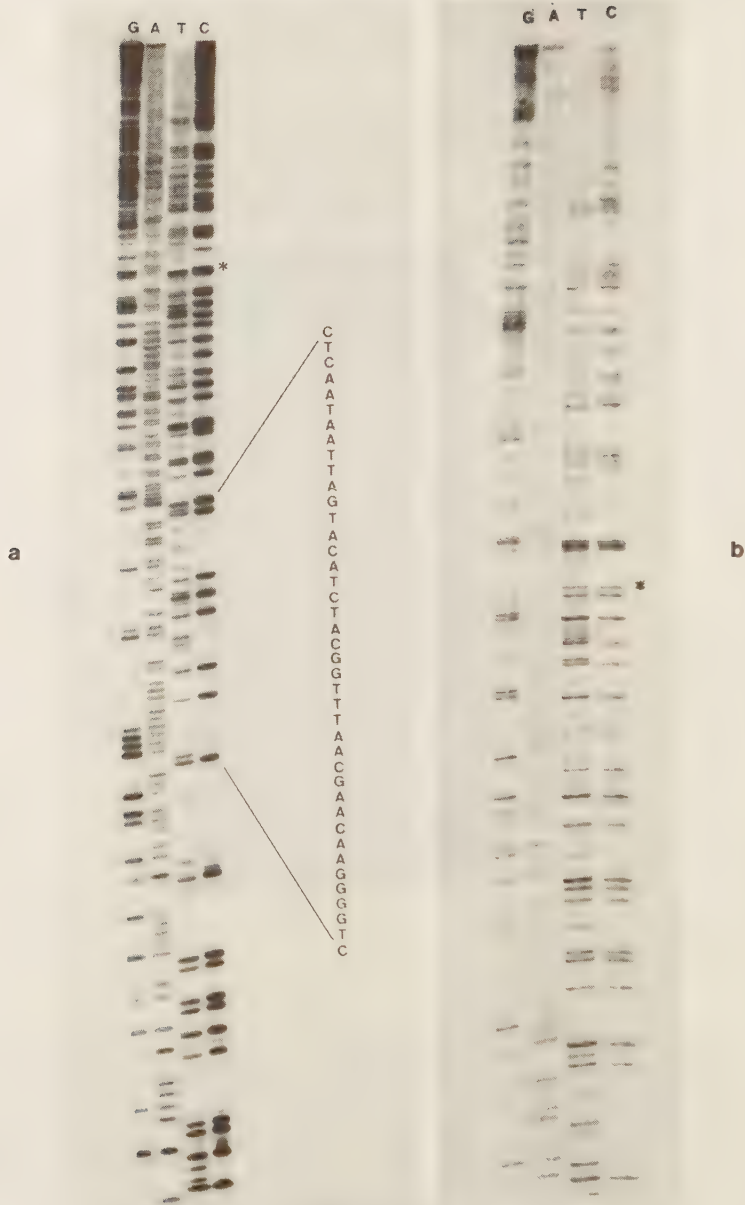


Abb. 17 Autoradiogramme der Sequenzierungsgele (8%) des Hpa I - Bal I-Fragments aus dem MuhP1-G-Segment (Sequenz b). a) Laufzeit 60min b) Laufzeit 150min, bei 2200V. Mit * ist die crossover-Stelle bezeichnet.

Die aus den Fragmenten erhaltenen Sequenzen sind in Abb. 18 (a,b,c) dargestellt.

Abb. 18 Die partiellen Sequenzen der Fragmente a,b,c.

a)

```

5'-ACTATATTTTTCCCAAAGATAGCGTTGTTATCGCGCATCTGAATCCACATACCATTACTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGTTAATAGCAAAACGGTCTGAAATTGTCTCCCCTGAAACATTAAAGGCCACGCCCCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAACAGCGCCAGTAGCGTTATTAATCCATAATGGCCTTAATCCGTTATAAGTCCCCATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGTCACCGGAGTTTGTCAACATGAAGTATGTATTGAACCATCATTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

b)

```

5'-ACACTGATAGCACTCAGGCGTTACTTCGCCAGAATCACGCCGACCGAAAAGTTCGTGATAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGAACTGGGGAACAAGCAATTTGGCATCTACATGATTAATAACTCGAGGACAGCCAATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCACCGATGGTCAGGCGTACATGAACAATAACGGTAACTGGCTTTGCGGTGCGCAAATTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCCCGGAAATTATGGCAATTTTGACTCGCGCTATGTGAGAGATGTCCGACTTGGCACAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGTTGTTTCGATTGATGGCGCGTGGAGGGCGTTATGAAAGAACCGGACACGCACTTACCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GATTAAGGATTATTG
-----+-----

```

c)

```

5'-GGATTATTGGTGAAGTTGATGGCGATGATGACGCTATCTTCAGGCCGATACAAAAATACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCAATGGCATATGGTATAACGTGCGCACAGGTGTAAATTATGCAGCACTTAAAAAATATCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCAGGAAACCCAAAGACAAAAGAGCAATACCAATTAACAAAAGATTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

Diese Sequenzen konnten mit Hilfe ihrer gegenseitigen Überlappungen und der bekannten Sequenz von Mu G(+) zusammengesetzt werden. Die Abbildung 19 zeigt einen Vergleich der gesamten Sequenz mit der Sequenz von Mu G(+).

Abb. 19 Vergleich der MuhP1-Sequenz mit Mu G(+).

a) Die MuhP1-Sequenz entspricht der Sequenz von P1 (Kardas, 1984) und wurde daher entsprechend numeriert. Die in Aminosäuren übersetzte Sequenz für MuhP1 wurde im Einbuchstabencode dargestellt. Nur die in Mu unterschiedlichen Basen sind angegeben.

b) Vergleich zwischen MuhP1- und Mu G(+)-Sequenzen mit dem Computerprogramm BESTFIT. Die Homologie zwischen den beiden Sequenzen beträgt 60%.

a)	
MuhP1	
3344	TAATGATGGTTCAAATACATACTTCTGTTGACAACTCCGGTGACAACATGGGGACTTA 3403
	ATTACTACCAAGTTTATGTATGAAGTACAACCTGTTGAGGCCACTGTTGTACCCCTGAAT
Mu	
1292	N D G S N T Y F M L T N S G D N M G T Y 1351
3404	TACGGGATTAAGGCCATTATGGATTAATAACGCTACTGGCGCTGTTTCGATGGGGCGGTGG 3463
	ATTGCGTAATTCGGTAATACCTAATTATTGGCATGCCGCGACAAAGCTACCCCGCAAC
	N G L R P L W I N N A T G A V S M G R G
1352	1411
3464	CCTTAATGTTTCAGGGGAGACCTTTCAGACCGTTTGTCTATTAACAGCAGTAATGGTAT 3523
	GGAAATACAAAGTCCCCTCTGTGAAAGTCTGGCAAAACGATAATTGTCGTCATTACCAT
	L N V S G E T L S D R F A I N S S N G M
1412	T T 1471
3524	GTGGATTGAGATGCGCGATAACAACGCTATCTTTGGGAAAAATATAGTTAACTGATAG 3583
	CACCTAAGTCTACGGCTAATTGTTGGGATAGAAACCCCTTTTATATCAATTGGTACTATC
	W I Q M R D N N A I F G K N I V N T D S
1472	1531
3584	CACTCAGGCGTTACTTCGCCAGAATCACGCCGACCGAAAGTTCGTGATAGGTGAACCTGGG 3643
	GTGAGTCGGCAATGAAGCGGTCTTAGTGGCGCTGGCTTCAAGCACTATCCACTTGACCC
	T Q A L L R Q N H A D R K F V I G E L G
1532	G G C A T A T C G T 1591
3644	GAACAAGCAATTTGGCATCTACATGATTAATAACTCGAGGACAGCCAATGGCACCGATGG 3703
	CTTGTTCTGTTAAACCGTAGATGTACTAATTATTGAGCTCCTGTGCGGTACCGTGGCTACC
	N K Q P F G I Y H I N N S R T A N G T D G
1592	A T A 1651
3704	TCAGGCGTACATGAACAATAACGGTAACCTGGCTTTGCGGTGCGCAAAATATTCCCGGAAA 3763
	AGTCGCGATGTACTTGTATTGGCATTGACCGAAACGCCACGCGTTTAAATAGGGCGCTTT
	O A Y H N N N G N W L C G A Q I I P G N
1652	G T A T A T G G C G 1711
3764	TTATGSCAATTTTGACTCGCGCTATGTGAGAGATGTCCGACTTGGCACACGTTGTTGTTG 3823
	AATACCGTTAAACTGAGCGCGATACACTCTCTACAGGCTGAACCGTGTGCACAACAAGC
	Y G N P F D S R Y V R D V R L G A T R V V R
1712	C C C C C T C T G G A T A G T C A C G A C 1771
3824	ATTGATGGCGCGTGAGGGCGTTATGAAAGAACCGGACACGCACTTACCGGATTAAGGAT 3883
	TAACTACCGCGCACTCCCGCAATCTTCTTGGCCTGTGCGTGAATGGCTAATTCCTA
	L M A R G C G R Y E R T G H A L T G L R I
1772	TGACGCGTT TC C T ATTACA G CGTC T T T T A A T T C A T C 1831
3884	TATTGGTGAAGTTGATGGCGATGATGACGCTATCTTCAGGCGGATACAAAAATACATCAA 3943
	ATAACCACTTCAACTACCGCTACTACTGCGATAGAAGTCGGCTATGTTTTATGTAGTT
	I G E V D G D D A I F R P I Q K Y I N
1832	C A C CTGG AATGC G GA GG A GA AAGGTTTAT C GTCGGGTTACG 1891
3944	TGGCATATGGTATAAGTTCGCACAGGTGTAATTATGCAGCACTTAAAAAATATCAGGTC 4003
	ACCGTATACCATATTGCGAGCGTGTCCACATTTAATACGTCGTGAATTTTTATAGTCCAG
	G I W Y N V A Q V *
1892	GAAT CAACGG C TGGTATA T AGCG GCGCCTGATTA G TGC TCTGA AAA 1951
4004	AGGAACCCAAAGACAAAAGACAAATACCAATTAACAAAAGATTTTG 4050
	TCCTTTGGGTTTCTGTTTTCTCGTTATGGTTAATGTTTCTAAAAAC
1952	TT GT AG A TCC A A T A GAGCAAT TC GCT ACAA 1998

b)

3344 TAATGATGGTTCAAATACATACTTCATGTTGACAAACTCCGGTGACAACA 3393
 |||||
 1292 TAATGATGGTTCAAATACATACTTCATGTTGACAAACTCCGGTGACAACA 1341
 |||||
 3394 TGGGGACTTATAACGGATTAAAGGCCATTATGGATTAATAACGCTACTGGC 3443
 |||||
 1342 TGGGGACTTATAACGGATTAAAGGCCATTATGGATTAATAACGCTACTGGC 1391
 |||||
 3444 GCTGTTTCGATGGGGCGTGGCCTTAATGTTTCAGGGGAGACACTTTCAGA 3493
 |||||
 1392 GCTGTTTCGATGGGGCGTGGCTTAATGTTTCAGGGGATACACTTTCAGA 1441
 |||||
 3494 CCGTTTTGCTATTAACAGCAGTAATGGTATGTGGATTTCAGATGCGCGATA 3543
 |||||
 1442 CCGTTTTGCTATTAACAGCAGTAATGGTATGTGGATTTCAGATGCGCGATA 1491
 |||||
 3544 ACAACGCTATCTTTGGGAAAAATATAGTTAACACTGATAGCACTCAGGCG 3593
 |||||
 1492 ACAACGCTATCTTTGGGAAAAATATAGTTAACACTGATAGCGCTCAGGCG 1541
 |||||
 3594 TTACTTCGCCAGAATCACGCCGACCGAAAGTTTCGTGATAGGTGAAGTGGG 3643
 |||||
 1542 TTGCTTCGCCAGAATCACGCCGACCGCAAATTTATGATTGGCGGTCTGGG 1591
 |||||
 3644 GAACAAGCAATTTGGCATCTACATGATTAATAACTCGAGGACAGCCAATG 3693
 |||||
 1592 AAATAAGCAATTTGGCATCTACATGATTAATAACTCAAGGACAGCCAATG 1641
 |||||
 3694 GCACCGATGGTCAGGCGTACATGAACAATAACGGTAACTGGCTTTGCGGT 3743
 |||||
 1642 GCACCGATGGTCAGGCGTACATGGATAATAACGGAACTGGTTATGCGGT 1691
 |||||
 3744 GCGCAAATTATTCCCGGAAATTATGGCAATTTTGACTCGCGCTATGTGAG 3793
 |||||
 1692 GCTCAGGTCATTCCGGGAAATTACGCCAACTTTGACTCCCGCTACGTGCG 1741
 |||||
 3794 AGATGTCCGACTTGGCACACGTGTTGTTTCGATTGATGGCGCGTGGAGGGC 3843
 |||||
 1742 TGACGTTCCGCTGGGAATC..AGTCACTGACTGACGGCTTGTCTCGTGA 1789
 |||||
 3844 GT..TATGAAGAACCGGACACGCACTTACCGGATTAAGGATTATTGGTG 3891
 |||||
 1790 TTACAAGGCGTCATCCGGTCATGTTATTACAGGTTTTCATACCAATGGCG 1839
 |||||
 3892 AAGTTGA.....TGGCGATGATGACGCTATCTTCAGGCCGATACAA 3932
 |||||
 1840 ACTGGGAAATGCAGGGAGGGGATGACAAGGTTTATATCCGTCCGGTTCAG 1889
 |||||
 3933 AAATACATCAATGGCATATGGTATAACGTCGCACAGGTGTAAATTATGCA 3982
 |||||
 1890 AAGAATATCAACGGTACCTGGTATAATGTAGC.GAGCGCTGATTATGAT 1938
 |||||
 3983 GCACTTAAAAAATATCAGGTACAGGAAACCCAAAGACAAAAGAG 4025
 |||||
 1939 GCATCTGAAAAACATTAAGTCAGAAAATCCAAAACTAAAGAG 1981
 |||||

Die sequenzierte Region des Hybridphagen umfaßte 631 bp des Gens S und 70 bp des Gens U. Der Leserahmen des Hybrid-Gens S entspricht bis auf zwei Aminosäuren der Länge des Mu-S-Gens (variable Teil).

Die ersten 120 Basenpaaren der Sequenz sind mit dem entsprechenden Bereich von Mu vollständig homolog. Häufige Basenaustausche treten im C-terminalen Ende des Gens S von MuhP1 ab Position 3746 auf. Im Bereich um diese Position muß das "crossover" des P1-G-Segments mit Mu stattgefunden haben. Die stark nichthomologe Region könnte für die Bindung des Lipopolysaccharides kodieren und würde damit die Veränderung des Wirtsbereiches im Hybrid erklären.

Spätere Ergebnisse zeigten, daß die Sequenz von MuhP1 mit der Sequenz von P1 in der entsprechenden Region identisch ist (Kardas, 1984). Diese Region ist ein Teil des Gens 19, das wie das S Gen durch G- Inversion an- und abgeschaltet wird und ebenfalls an der Schwanzfaserbildung beteiligt ist (Iida, 1984).

4.2.3.3 Sequenzierung des Mu G(-)h Phagen

Da aus dem MuhP1-Hybrid bekannt ist, daß Mutationen im variablen Teil des Gens S eine geänderte Wirtsspezifität in G(+)-Orientierung zur Folge hat, kann man erwarten, daß Mu G(-)h durch eine Mutation des S' Gens entstanden ist. Aus diesem Grund wurde der variable Teil des Gens S' sequenziert. Zur Sequenzierung wurden Enzyme gewählt, die in Mu G(-)h 101 und Mu G(-) das gleiche Restriktionsmuster zeigen (Abb. 20, 21).

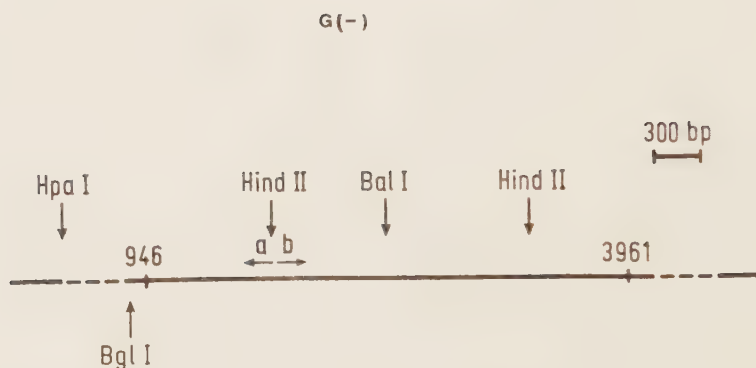


Abb. 20 Sequenzierungsstrategie im G-Segment des Mu G(-)h 101-Phagen.

Die HindII-Fragmente wurden nach 5'-Endmarkierung und Trennung auf 1.2% Agarose eluiert. Fragment a (ca. 2500 bp) wurde mit BglI und Fragment b (ca. 1600 bp) mit BalI nachverdaut. Die Pfeile zeigen die Richtung der Sequenzierung.

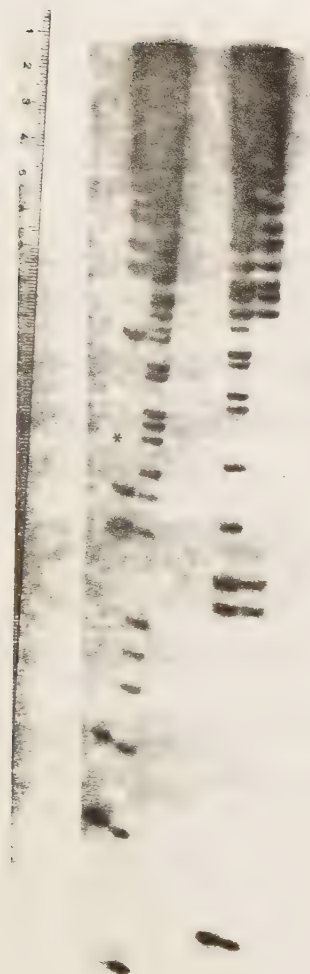


Abb. 21 Autoradiogramme des Sequenzierungsgels (20%) des Hind II - Bal I-Fragments aus dem Mu G(-)h-G-Segment (Laufzeit 30min bei 3000V). Mit * ist der Basenaustausch von G (in Mu G(-)) zu A (in Mu G(-)h) bezeichnet (Sequenz b).

Die aus den Fragmenten erhaltenen Sequenzen sind in Abb. 22 dargestellt.

Abb. 22 Partielle Sequenzen der Fragmente a und b.

a)

```

5'-ACTGAACCCGTAACGACATAACCTGACCTGTCAGACCAGCCGGGACCATTCCATGTCTGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAGATGACAGACCGCCAAGACGAATACCTGTAATAAACCTTGAGTTACATTCTGCCTGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTATATGCACCAACATCTCCCGCTGATGGCTTACGTGTTGTGGTGTAATTTCTGACCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCAGCTTCGAATCCGTAACCATCACGCGCTGAACGATAAAAAATACCGCCGTTCTGTAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCACACGGAACGTGTACGGCAGGGCAACTCCCGTATTTCATATTGAAGTGGAGGATTAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGATGCGCCACCAATATTT
-----+-----+-----+

```

b)

```

5'-ACGGAAACCGTGATAAATTAATTGATACAACTCAGGCAAGGCCAATTCAGTATTGCATTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGGAACGTGGTATAACGCGGGGAGTATTTAATTATGATGCACTTAAAAAATATTACTGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGCAACCCTAAAAACAAAAGAGCAATACCAGCTAACGAAACAATTTAACATCAATGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTATACAGAGGATGGGAAAAACTGGTATGAGGAACAAAAGAACTTTCAGCCTGATACGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAAAATGGTCTATGACCACAACGGCGTTATTATTTGTATTGAAAAGGATGTTTCAGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

Diese Sequenzen konnten mit Hilfe der bekannten Sequenz von Mu G(-) zusammengesetzt werden (Abb. 23).

Abb. 23 Partielle Sequenz der Gene S' und U' in Mu G(-)h. Das ausgetauschte Nucleotid im Vergleich zur Sequenz von Mu G(-) ist durch ein Kreuz gekennzeichnet.

Die sequenzierte Region (340bp in S' Gene und 280bp in U' Gene) enthielt eine Punkt-Mutation im C-terminalen Ende des S' Gens (Position 2573). Diese Punkt-Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch von Glu (K) nach Lys (E).

4.2.3.4 Charakterisierung der Mu pAp1 Phagenmutante.

Eine andere Wirtsbereichsmutante wurde bei der Plattierung des Phagen Mu pAp1 auf Mu G(+)-resistenten Stämmen von *E.coli* K12 ($\text{Mu}^{\text{r}}\#31$ und $\text{Mu}^{\text{r}}\#35$) erhalten. Der Phage Mu pAp1 enthält eine Insertion des Ap^r Gens in seinem rechten IR. In diesen Phagen liegt das G-Segment nur in einer Orientierung (Leach & Symonds, 1979). Durch einen Doppel-Verdau mit Pst1 und Kpn1 wurde die (+)-Orientierung des G-Segments bestimmt (Abb. 24). Lysate von Mu pAp1-Phagen plattieren mit gleicher Effizienz auf *E.coli* K12 wie Mu G(+), zeigen jedoch auch auf Mu^{r} -Stämmen einen geringen Titer ($10^2 - 10^3$). Die niedrige Plattierungseffizienz auf den $\text{Mu G(+)}^{\text{r}}$ -Stämmen wies auf eine Mutante von Mu pAp1 hin. Aus Einzelplaques wurden durch mehrmalige Infektion von $\text{Mu}^{\text{r}}\#31$ hochtitrige Lysate erhalten, die auf *E.coli* K12 und $\text{Mu}^{\text{r}}\#31$ mit gleichem Titer plattieren. Auch *E.coli* S1652, der eine ähnliche Lipopolysaccharid-Struktur wie *E.coli* K12 $\text{Mu}^{\text{r}}\#31$ (α 1-3 endständige Glucose), erwies sich als Wirt für Mu pAp1h-Phagen. Obwohl diese Phagenmutante einen erweiterten Wirtsbereich als der Mu pAp -Phage besaß, wurde die Phagenmutante wie dieser nur durch *E.coli* K12-LPS inaktiviert (Tabelle 16).



Abb. 24 Restriktionsverdau von Mu pAp1 (1) bzw. von Mu G(+) (2) mit KpnI und PstI (1,2 Agarose, 75mA, 4h).

Tabelle 16

Die Sensitivität der Stämme gegen Mu pAp1

Phage	C600		S1652		E.coli C		C600 Mur#31	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Mu G(+)	1	0	10^{-9}	100	10^{-9}	100	10^{-9}	100
Mu pAp1	1	0,2	10^{-7}	100	10^{-9}	100	10^{-7}	100
Mu pAp1h	1	0,3	1	35	10^{-9}	100	1	30

a) E.O.P.

b) Inaktivierung durch LPS (% von überlebenden Phagen)

4.2.3.5 Sequenzierung der Mu pAp1 Phagen

Zur Untersuchung einer möglichen Korellation zwischen dem Wirtsbereich und der DNA-Sequenz im S Gen wurde diese Region in beiden Phagen sequenziert. Zur Sequenzierung wurde die Phagen-DNA mit verschiedenen Enzym-Kombinationen fragmentiert (Abb. 25, 26).

G(+)

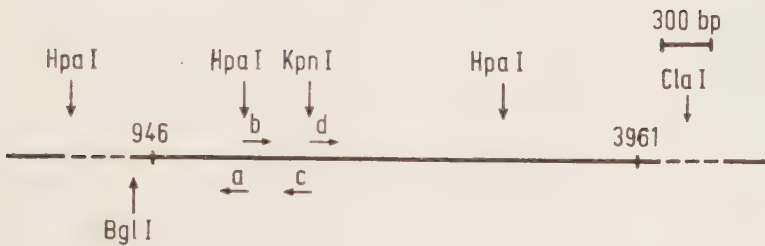


Abb. 25 Sequenzierungsschema des G-Segments in Mu pAp1-Phagen. Fragmente a, b, c wurden durch Doppelverdau hergestellt. Der KpnI-Schnitt wurde am 5'- so wie am 3'- Ende markiert. Das ca 3000 bp lange HpaI-Fragment wurde nach Isolierung mit BglI verdaut.

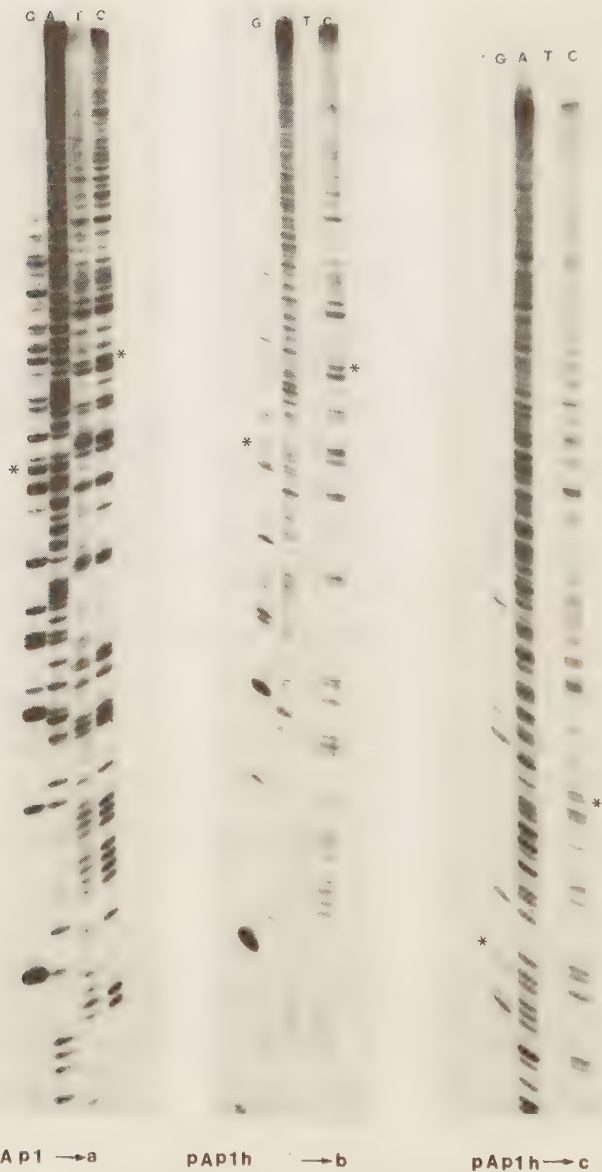


Abb. 26 Autoradiogramme der Sequenzierungsgele (8%) des KpnI-HpaI Fragments aus dem G-Segment von Mu pAp1-Phagen. a) und b) Laufzeit 60 min und c) Laufzeit 150 min bei 2200V. Mit * sind die Basenaustausche von A bzw. T in Mu G(+) zu G bzw. C in Mu pAp gekennzeichnet. (Sequenz c).

Die aus den Fragmenten erhaltenen Sequenzen sind in Abb. 27 dargestellt.

Abb. 27 Partielle Sequenzen der Fragmente a,b,c,d.

a)
 5'-ACTATATTTTTCCCAAAGATAGCGTTGTTATCGCGCATCTGAATCCACATACCATTACTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTGTTAATAGCAAAACGGTCTGAAAGTGTATCCCTGAAACATTAAGACCACGCCCATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAAACAGCGCCAGTAGCGTTAT
 -----+-----+-----

b)
 5'-ACACTGATAGCGCTCAGGCGTTGCTTCGCCAGAATCACGCCGACCGCAAATTTATGATTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGGTCTGGGAAATAAGCAATTTGGCATCTACATGATTATAACTCAAGGACAGCCAAATGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACCGATGGTCAGGCGTACATGGATAATAACGGAACTGGTTATGCGGTGCTCAGGTCAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCCGGGAAATTACGCCAACTTTGACTCCCGCTACGTGC
 -----+-----+-----+-----

c)
 5'-ACCGTTGATATTCTTCTGAACCGGACGGATATAAACCTTGTCTATCCCTCCCTGCATTTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAGTCGCCATTGCTATGAAAACCTGTAATAACATGACCGCATGGCGCCTTGTAATCAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGACAAGCCGCCAGTCAGTGACTGAGTTCCAGCCGAACGTCACGCACGTACCGGGAGTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAGTTGGCGTAATTTCCCGGAATG
 -----+-----+-----+-----

d)
 5'-CTGGTATAATGTAGCGAGCGCCTGATTATGATGCATCTGAAAAACATTAAGTCAGAAAAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAAAAACTAAAGAGCAATATCAGCTAACAAAGAATTTTGATGTTATCTGGTTATGGTCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAAGACGGGAAAAACTGGT
 -----+-----+-----+-----

Diese Sequenzen konnten mit Hilfe der bekannten Sequenz von Mu G(+) zusammengesetzt werden (Abb. 28).

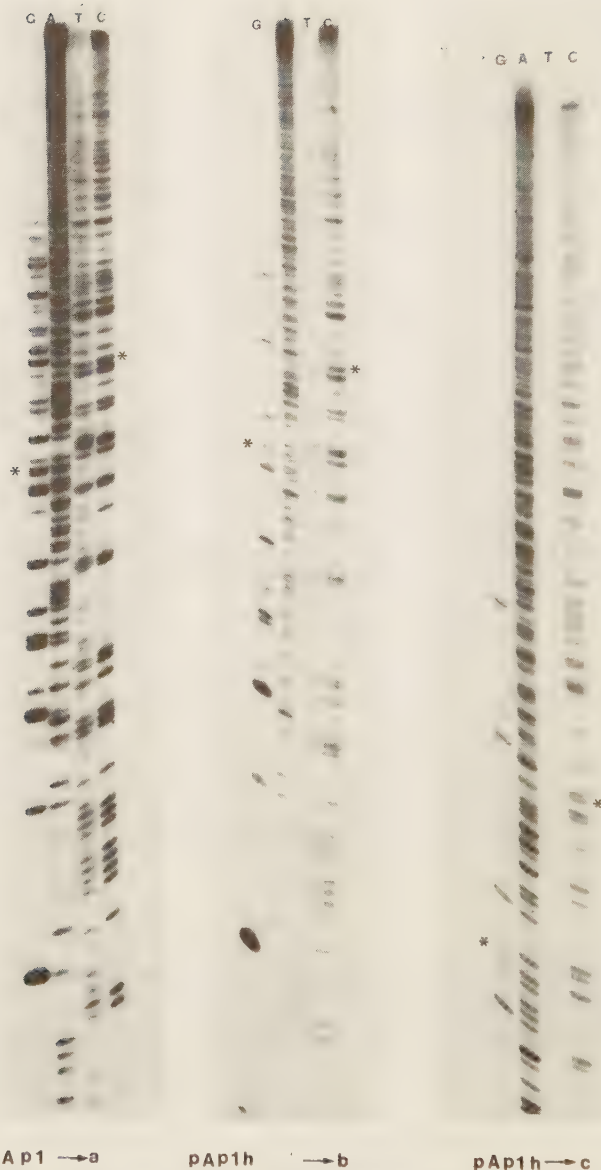


Abb. 26 Autoradiogramme der Sequenzierungsgele (8%) des KpnI-HpaI Fragments aus dem G-Segment von Mu pAp1-Phagen. a) und b) Laufzeit 60 min und c) Laufzeit 150 min bei 2200V. Mit * sind die Basenaustausche von A bzw. T in Mu G(+) zu G bzw. C in Mu pAp gekennzeichnet. (Sequenz c).

Die aus den Fragmenten erhaltenen Sequenzen sind in Abb. 27 dargestellt.

Abb. 27 Partielle Sequenzen der Fragmente a,b,c,d.

a) 5'-ACTATATTTTTCCCAAAGATAGCGTTGTTATCGCGCATCTGAATCCACATACCATTACTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGTTAATAGCAAAACGGTCTGAAAGTGATCCCCTGAAACATTAAGACCACGCCCCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAACAGCGCCAGTAGCGTTAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

b) 5'-ACACTGATAGCGCTCAGGCGTTGCTTCGCCAGAATCACGCCGACCGCAAATTTATGATTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCGGTCTGGGAAATAAGCAATTTGGCATCTACATGATTATAACTCAAGGACAGCCAATGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCGATGGTCAGGCGTACATGGATAATAACGGAACTGGTTATGCGGTGCTCAGGTCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCGGGAAATTACGCCAACTTTGACTCCCGCTACGTGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

c) 5' - ACCGTTGATATTCTTCTGAACCGGACGGATATAAACCTTGTCATCCCCTCCCTGCATTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAGTCGCCATTGCTATGAAAACTGTAATAACATGACCGCATGGCGCCTTGTAATCACG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACAAGCCGCCAGTCA GTGACTGAGTTC CAGCCGAACGT CACGCACGTACCGGGAGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGTTGGCGTAATTTCCCGGAATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+

d) 5'-CTGGTATAATGTAGCGAGCGCTGATTATGATGCATCTGAAAAACATTAAGTCAGAAAAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAAAACTAAAGAGCAATATCAGCTAACAAAGAATTTTGATGTTATCTGGTTATGGTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAGACGGGAAAAACTGGT
-----+-----

Diese Sequenzen konnten mit Hilfe der bekannten Sequenz von Mu G(+) zusammengesetzt werden (Abb. 28).

102
ATA
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TAT
N

1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
ACGCTACTGGCGCTGTTTCGATGGGGCGTGGTCTTAATGTTTCAGGGGATACACTTTTCAG
TGCGATGACCCGCGACAAAGCTACCCCGCACCAGAATTACAAAGTCCCCTATGTGAAAGTC
A T G A V S M G R G L N V S G D T L S D

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
ACCGTTTTGCTATTAAACAGCAGTAATGGTATGTGGATTTCAGATGCGCGATAACAACGCTA
TGCGAAAACGATAAATTGTCGTCATTACCATACACCTAAGTCTACGCGCTATTGTTGCGAT
R F A I N S S N G M W I Q M R D N N A I

1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TCTTTGGGAAAAATATAGTTAACTGATAGCGCTCAGGCGTTGCTTCGCCAGAATCACG
AGAAACCCTTTTTATATCAATTGTGACTATCGCGAGTCCGCAACGAAGCGGTCTTAGTGC
F G K N I V N T D S A Q A L L R Q N H A

1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
CCGACCGCAAAATTTATGATTGGCGGTCTGGGAAATAAGCAATTTGGCATCTACATGATTA
GGCTGGCGTTTTAAATACTAACCGCCAGACCCTTTATTCGTTAAACCGTAGATGTACTAAT
D R K F M I G G L G N K Q F G I Y M I N

1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
ATAACTCAAGGACAGCCCAATGGCACCGATGGTCAGGCGTACATGGATAATAACGGAAACT
TATTGAGTTCCTGTGCGTTACCGTGGCTACCGATCGCATGTACCTATTATTGCCTTTGA
N S R T A N G T D G Q A Y M D N N G N W

1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
GGTTATGCGGTGCTCAGGTCATTCCGGGAAATTACGCCAACTTTGACTCCCGCTACGTGC
CCAATACGCCACGAGTCCAGTAAGGCCCTTTAATGCGGTTGAAACTGAGGGCGATGCACG
L C G A Q V I P G N Y A N F D S R Y V R

1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
GTGACGTTTCGGCTGGGAACTCAGTCACTGACTGGCGGCTTGTCTCGTGATTACAAGGCGC
CACTGCAAGCCGACCCCTTGAGTCAGTGACTGACCGCCGAACAGAGCACTAATGTTCCGCG
D V R L G T Q S L T G G L S R D Y K A P
D S

1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
CATCCGGTCATGTTATTACAGGTTTTTCATACCAATGGCGACTGGGAAATGCAGGGAGGGG
GTAGGCCAGTACAATAATGTCCAAAAGTATGGTTACCGCTGACCCTTTACGTCCCTCCCC
S G H V I T G F H T N G D W E M Q G G D

1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
ATGACAAGGTTTATATCCGTCCGGTTTCAGAAGAATATCAACGGTACCTGGTATAATGTAG
TACTGTTCCAAATATAGGCAGGCCAAGTCTTCTTATAGTTGCCATGGACCATATTACATC
D K V Y I R P V Q K N I N G T W Y N V A

1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
CGAGCGCCTGATTATGATGCATCTGAAAAACATTAAGTCAGAAAAATCCAAAACTAAAGA
GCTCGCGGACTAATACTACGTAGACTTTTTGTAATTCAGTCTTTTAGGTTTTTGATTTCT
S A *

1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
GCAATATCAGCTAACAAGAATTTTGATGTTATCTGGTTATGGTCCGAAGACGGGAAAAA
CGTTATAGTCGATTGTTTCTTAAAACTACAATAGACCAATACCAGGCTTCTGCCCTTTTT

CTGGT

2041

Abb. 28 Zusammengesetzte Sequenz des S-Gens im Mu pAp-Phagen.
Die Basenaustausche im Vergleich zur Sequenz von Mu G(+) sind mit * gekennzeichnet.

Die Sequenzen, die ca. 550 bp im S Gen und ca. 110 bp im U Gen umfassen, enthalten im Vergleich zu Mu zwei Punktmutationen im C-terminalen Ende des S Genes (Positionen 1774 und 1800), die zu Aminosäurenaustauschen von Asp und Ser (in Mu) zu Gly und Pro (in Mu pAp) führen. Im Vergleich zu Mu zeigen die beiden Phagen die gleichen Basenaustausche. Während Mu pAp1 denselben Wirtsbereich wie Mu hat, ist der Wirtsbereich der Mu pAp1h-Mutante erweitert. Die Sequenzunterschiede zwischen Mu G(+) und Mu pAp spiegeln sich nicht in einer Veränderung des Wirtsbereichs wieder. Andererseits kann der erweiterte Wirtsbereich von Mu pAp1h nicht durch die zwei Punktmutationen, die in beiden Mu pAp-Phagen auftauchen erklärt werden.

Solche Mutationen könnten vermutlich zu einer Veränderung der Rezeptor-Bindungsstelle führen. allerdings erst dann, wenn eine zusätzliche Mutation außerhalb der sequenzierten Region auftritt. Die dadurch bessere Exposition der veränderten Rezeptor-Bindungsstelle könnte im Fall der Mu pAp1h-Mutante für die Infektion anderer Stämme ausreichend sein, ohne daß jedoch eine nennenswerte Inaktivierung durch das LPS dieser Stämme erfolgen muß.

5. DISKUSSION

5.1 Die Phagenrezeptoren

Die für die Adsorption der Mu Phagen wesentliche strukturelle Komponente der Bakterienzellwand wurde in dem Lipopolysaccharidanteil lokalisiert (Kamp & Sandulache, 1983). Mu G(+) bindet an die terminale Glc α 1-2Glc Einheit des *E. coli* K12 LPS. Aufgrund der vergleichbaren ID₅₀ Werte könnte auch die konfiguratív gleiche GlcNAc α 1-2Glc Einheit des *E. coli* R2 Typs als Erkennungsstruktur fungieren (Sandulache, Prehm & Kamp, 1984). Eine unterschiedliche Struktur, die endständige Glc β 1-6Glc Einheit im LPS von *Erwinia carotovora*, (Sandulache & Prehm, 1985) dient als Rezeptor für Mu G(-)-Phagen (Sandulache, Prehm, Toussaint & Kamp, eingereicht).

Aus der Untersuchung anderer Phagen mit G-Segmenten wie P1, P7 und D108 kann man folgern, daß diese Phagengruppe eine vom Mu-Rezeptor verschiedene Struktur erkennt. Während P1 zwischen 1-2 oder 1-3 glycosidischer Bindung nicht unterscheidet (Sandulache, Ritthaler & Kamp, eingereicht),

hat das MuhP1-Hybrid eine eindeutige Affinität gegenüber letztgenannter Struktur. Die Kreuzung der G-Segmente von Mu und P1 führen somit im Hybrid zu einem Wirtsbereich, der sich von dem von Mu und teilweise von dem von P1 unterscheidet. Die Tatsache, daß der Phage D108 zwar weitgehend homolog zu Mu ist, aber die gleiche Rezeptor-Affinität wie P1 zeigt, könnte bedeuten, daß D108 ein natürlich vorkommendes Mu P1-Hybrid ist.

Alle oben erwähnten Phagen erkennen terminale oder verzweigte Zucker. Bei Mu fällt besonders auf, daß die Spezifität der Wechselwirkung zwischen Phagen und Wirt nicht nur von der Art des Zuckers, sondern auch von dessen glycosidischer Bindung und anomerer Konfiguration bestimmt wird.

Viele Phagen, die gram-negative Bakterien infizieren, erkennen als Rezeptor Zucker in exponierter Position in der LPS-Kette. Phagen wie $\epsilon 15$, g341, $\epsilon 34$ und P22 binden sich an wiederholende Einheiten des O-Antigens, wie z.B. Mannosyl-Rhamnosyl-Galactose (Lindberg, 1977; Wright et al., 1980). Im Gegensatz dazu sind Phagen wie Felix 01, C21, T4 (Prehm et al., 1976) und $\phi X174$ (Jazwinski, 1975; Feige & Stirm, 1976) auf Strukturen der "rough" Lipopolysaccharide angewiesen.

Obwohl das LPS als die am stärksten exponierte Komponente der Zellwandmembran gilt, gibt es Phagen wie T2, T5, T6 und Lambda, die Proteine der äußeren Membran als Rezeptor erkennen (Schwarz, 1975; Schwartz, 1980).

In einigen Fällen findet vor der spezifischen Bindung an den Proteinrezeptor eine unspezifische Wechselwirkung mit LPS statt. Die Reversibilität dieses Prozesses ermöglicht z.B. dem Phagen T5 sich entlang der Zellmembran zu bewegen und seinen Rezeptor, das *ton A* Protein, zu erreichen (Heller & Braun, 1979). Bei der Adsorption von T4 an *E.coli* K12 verbessert das LPS die Wechselwirkung mit dem Proteinrezeptor (Henning & Jann, 1978). Dabei muß das LPS eine möglichst komplette Struktur besitzen: ist die LPS-Synthese nicht vollständig, so kann das Proteinmuster beeinflusst

werden. Die Phagen Lambda und OX2 können auf diese Weise *E. coli* mit einem Defekt in der Heptose-Region nicht mehr infizieren (Tomas & Kay, 1984; Sukupolvi, 1984).

Für den Phagen Mu gibt es bis jetzt keinen Hinweis, daß eine zusätzliche Membrankomponente an der Adsorption beteiligt sein könnte.

5.2 Schwanzfasern

Phagenstrukturen wie "spikes" und Schwanzfasern gelten als Adsorptionsorganellen. Phagen wie P22, ϵ 15, ϵ 35 und ω 8 binden mit ihren "spikes" an die O-Ketten des LPSS. Phagen mit langen Schwanzfasern, wie P1 und T4 heften sich an LPS-core Strukturen. ϕ X 174 und St1 erkennen Strukturen des core-LPSS, aber besitzen keine der oben genannten Organellen (Wilson et al., 1970; Rapin & Kalker, 1971; Lindberg, 1977).

Trotz des Unterschieds in ihren Adsorptionsstrukturen haben die Phagen St1, P1, T4 und Mu ähnliche Rezeptoren und überlappende Wirtsbereiche. Diese Beobachtung führt zu der Hypothese, daß diese Phagen eine konvergierende Evolution durchgemacht haben.

5.2.1 Die Schwanzfasern der Mu- und P1-Phagen

Die Kreuzreaktion der P1-Phagen mit den Anti Mu G(+) Antikörpern, sowie die Erkennung ähnlicher Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch P1 und Mu weisen auf ähnliche Strukturen der Schwanzfaser der beiden Phagen hin. Die Schwanzfasern werden von zwei Domänen gebildet: einer konstanten und einer variablen. Durch DNA-Analyse der G-Seq-

ment-Gene von Phagenmutanten und Phagenhybriden wurde die LPS-Bindungsstelle im C-terminalen Bereich der variablen Domäne lokalisiert. Im Folgenden werden verschiedene Teilaspekte, die die Morphologie und Struktur der Schwanzfasern betreffen, aufgegriffen und im Zusammenhang mit Ergebnissen anderer Untersuchungen gebracht.

5.2.1.1 Beschreibung der G-Segment-Gene

Obwohl Mu und P1 in derselben Bradley's Gruppe (A) angeordnet sind, sind sie nach elektronmikroskopischer Messung unterschiedlich groß. Die P1-Schwanzfaser ist ungefähr dreimal so lang wie diejenige von Mu (Abb. 29). Wahrscheinlich sind die Gene im G-Segment, das den Wirtsbereich der Phagen bestimmt, an der Bildung der Schwanzfasern beteiligt.

Ein großer Leserahmen, der in der α -Region außerhalb des G-Segments beginnt, und ein Drittel des G-Segments umfaßt, kodiert für das S-Gen von Mu. Ein kleinerer sich daran anschließender Leserahmen kodiert für das U-Gen. Möglicherweise werden beide Gene von einem einzigen Promotor, der in der α Region liegt, transkribiert, von dem aus auch die Transkription der S' und U' Gene erfolgt (Kahmann & Kamp, in Vorbereitung).

Während U und U' innerhalb des G-Segments liegen und sehr homolog zueinander sind (ca. 60%), werden S und S' aus einem konstanten N-terminalen Teil (Sc) in α und einem variablen C-terminalen Teil (Sv) im G-Segment gebildet. Die Homologie zwischen diesen Genen erstreckt sich daher nur auf deren konstanten Teil. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für das

P1-G - Segment.

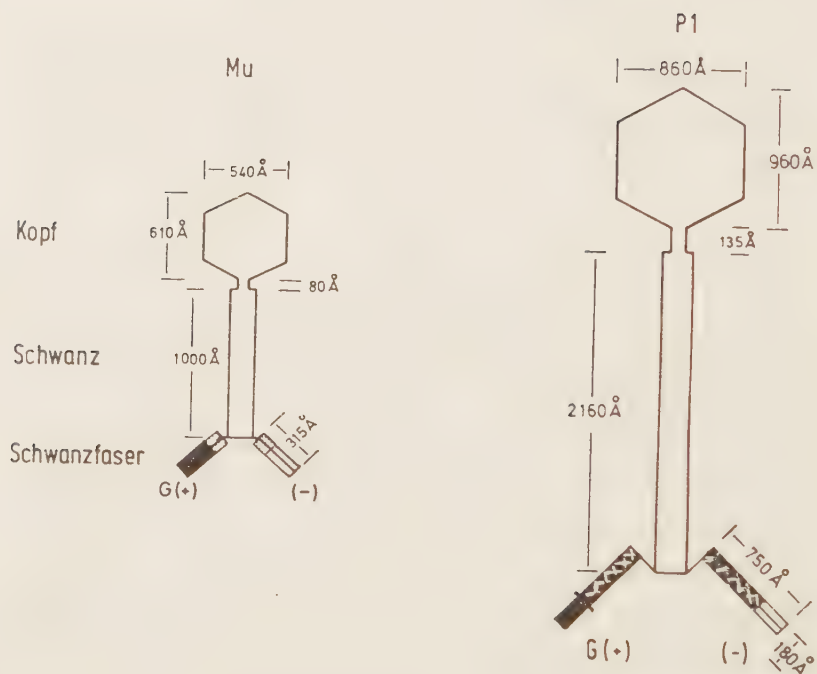


Abb. 29 Schematische Darstellung von P1- (Walker & Walker, 1983) und Mu-Phagen. Die Schwanzfasern sind in schwarz bzw. weiss für den variablen Teil und mit Punkten oder straffiert für den konstanten Teil gezeichnet.

Die Nukleotid-Sequenzierung innerhalb und außerhalb des P1-G-Segments (Sengstag & Arber, 1983; Kamp et al., 1984) liefert den Hinweis auf ein Gen von gleicher Größe im variablen Teil wie Sv. Der konstante Teil dieses Gens (Gen 19) ist ca. dreimal so groß, wie der entsprechende Sc Teil von Mu. Die Homologie zwischen den variablen Teilen der Gene S und 19 ist weitaus größer als zwischen den variablen Teilen der Gene S und S' bzw. 19 und 19'. Die dem U bzw. U' Gen entsprechenden Gene, tfs bzw tfs' (tfs = tail fibre specificity) zeigen zu diesen eine sehr hohe Homologie (Tabelle 17)

Tabelle 17

Sequenzhomologien zwischen den variablen Teilen der Schwanzfasergene von Mu und P1 (%) *

	S	S'	19	19'
S	100	21	85	19
S'		100	19	82
19			100	17
19'				100
	U	U'	tfs	tfs'
U	100	58	93	54
U'		100	58	91
tfs			100	54
tfs'				100

* Die Daten wurden mit dem Computerprogramm BESTFIT erstellt.

5.2.1.2 Die Beteiligung der Gene des G-Segments an der Schwanzfaserbiosynthese.

Die Tatsache, daß sich Mutationen im C-terminalen Ende von S bzw. S' (Abb. 30a) in einer unterschiedlichen Rezeptorerkennung widerspiegeln, spricht dafür, daß diese Gene für den entscheidenden Teil der Mu- Schwanzfaser verantwortlich sind.

Durch Kreuzung des P1 G-Segments in Mu wurden Hybride erhalten, deren Crossoverstelle sich innerhalb der letzten 250 bp des Schwanzfasergens befindet (Abb. 30 b). Der Wirtsbereich dieser Hybride beweist zusätzlich, daß die Erkennungsstelle für das LPS in diesem Bereich des Proteins liegt.

Es gibt Hinweise, daß das Gen S von Mu tatsächlich exprimiert wird. Durch elektrophoretische Analyse wurde in Minizellen und Phagenpräparaten ein Protein nachgewiesen, dessen Molekulargewicht von ca. 56.000 D (Giphart-Gassler et al., 1982) mit dem des hypothetischen Proteins aus 504 Aminosäuren übereinstimmt (nach Sequenzierungsdaten von Kahmann). Dieses Protein fehlt bei S-Amber-Mutanten.

Ebenfalls nachgewiesen wurde das Gen 19' Produkt des Phagen P1, Molekulargewicht von ca. 105.000 D (Walker & Walker, 1983; Iida, 1984) mit dem des hypothetischen Proteins aus 928 Aminosäuren identisch ist (Kamp, 1984). Amber-Mutanten in diesem Gen haben die Fähigkeit verloren Schwanzfasern zu bilden und können den Wirt deshalb nicht mehr infizieren.

S
19

1 MFPYIDNDSCVTVMPVSAQRSAIVRWFSEGDGNNVITWPGMDWFNIVQAE 50

 426 ITGALTGNADTATKLKTARNINGVRFDGSGDININTLVSRGRVTALEANA 475

 51 LLNLTLEEAGIQPDKTKLNQALSIAIMSNWALLIKNNLSEIKTAGASAQ 100

 476 QCTSGIQLYEAYNNGYPSPYGNVLHLKGATAAGEGELFIGWSGTSGAHAP 525

 101 RTARENLDIYDASLNKKGLV...QLTSATDSPSETLAATAKAVKIAMDNAN 148

 526 VHIRSRWDTHSANWFQWAAQVHTSKDSIPGVNAKGDDQDTSGNAATATKLQT 575

 149 ARLAKDRNGADIPNKPFIQNLGLQETVMARNNAVQKNGDTLSGGLTFFEN 198

 576 ACTINGVSPFGSKNIELTAEDLMLQETVMKADNAVQKTGDTLSGGLTFFEN 625

 199 DSILAWIRNTDWAKIGPKNDADSDTDSYMWFPETGDNMGNEYFKWRSKQSTT 248

 626 DSILAWIQNTDWAKIGPKNDADSDADSYMWFPETGDNMGNEYFKWRSKQSTT 675

 249 TKDLHNLKWDALSVLVNAIVNCEVISKANGLRIAYGMYGFFIRNDGSNT 298

 676 TKDLTNLKWDALEYVLVNAIVNGEAISKANGLRIAYGMYGFFIRNDGSNT 725

 299 YFMLTNSGDNMGTYNGLRPLWINNATGAVSHGRGLNVSGDTLSDRFAINS 348

 726 YFMLTNSGDNMGTYNGLRPLWINNATGAVSHGRGLNVSGETLSDRFAINS 775

 349 SNGMWIQMRDNNAIFGKNIVMTDSAQALLRONHADRKFHIGGLGNKQPGI 398

 776 SNGMWIQMRDNNAIFGKNIVMTDSTQALLRONHADRKFVIGELGNKQPGI 825

 399 YMINNSRTANGTDGQAYMDNNGNWLCGNOVIPGMYANFDSRYVRDVR LGT 448

 826 YMINNSRTANGTDGQAYMNNNGNWLCGNOIIPGNYGNFDSRYVRDVR LGT 875

 449 QSLTDGLSRDYKASSCHVITGFHTNGDWEMOGGDDKVYIRPVOKNINGTW 498

 876 RVVRLMARGGRYERTGHALTGLRIIG...E.VDGGDDAIFRPIQKYINGIW 922

 499 YNVA 502

 923 YNVA 926

MuhP1

Da auch Amber-Mutanten in U keine Schwanzfasern mehr bilden können (Grundy & Howe, 1984) und auch keine spezifische Antikörper mehr erkennen, könnte das U-Produkt am Schwanzfaseranbau beteiligt sein. Untersuchungen an T4-Amber Mutanten haben gezeigt, daß die Bildung der komplizierten Schwanzfasern von T4 ein "self assembly" Prozeß ist, wobei die Dimerisierung des proximalen und distalen Teils der Schwanzfaser und deren Zusammensetzung von nichtstrukturellen Gen-Produkten katalysiert werden (Wood & Bishop, 1973; Hermann & Wood, 1981; Revel, 1981). In ähnlicher Weise könnte das U-Gen-Produkt eine katalytische Rolle bei der Zusammensetzung der Mu-Schwanzfaser übernehmen, oder auch die Kopplung der Schwanzfaser an die Basalplatte ermög'lichen. Auf Basis der Homologie zu U und U' könnten tfs bzw tfs' eine ähnliche Rolle in P1 spielen.

5.2.1.3 Analyse der Schwanzfasern auf Proteinebene

Die Analyse der Aminosäuresequenz bei S, S' und 19 zeigt eine Hydrophobizität zwischen 49% und 51,6%. Dabei verteilen sich die hydrophoben Aminosäuren gleichmäßig auf den konstanten und variablen Teil der Schwanzfaser.

Die erhöhte Hydrophobizität eines Proteins hat häufig eine β -Faltblattstruktur zur Folge.

Auch bei Anwendung der empirischen Regeln von Chou und Fasman (1978) über die Sekundärstruktur von Proteinen auf S, S' und 19, ergeben sich abwechselnde Regionen von β -Faltblatt und β -turn, wie es für eine antiparallele β -Struktur zu erwarten ist (Abb. 31).

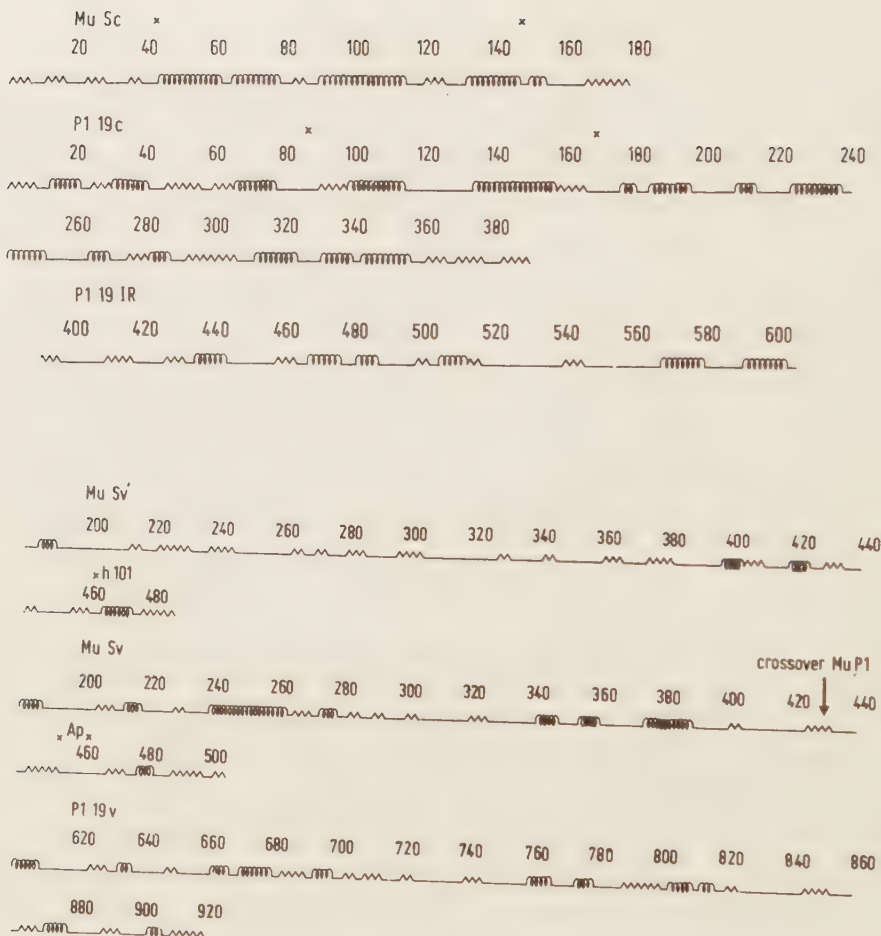


Abb. 31 Die hypothetische Sekundärstruktur der Schwanzfaserproteine bestimmt nach Chou-Fasman Regeln (1978)

Die Beta-Struktur ist mit Zacken, alpha-Helix mit Spulen und beta-Turn mit Linie gezeichnet. Die Sternchen deuten die homologe Region in Mu Sc und P1 19c an (A). Die Punktmutationen sind in S bzw. in S' angekreuzt. Der Pfeil zeigt die crossover-Stelle des P1-G-Segments in dem Phagen Mu (B).

Die β -Struktur ist jedoch sehr unregelmäßig: ihre Länge schwankt zwischen 5 und 12 Resten. Ähnliches findet man beim Protein 37 des Phagen T4 (7-15 Reste), das im übrigen ebenfalls eine erhöhte Hydrophobizität ausweist (Earnshaw, 1979; Oliver & Crowther, 1981). Während im Protein 37 jedoch keine α -helikalen Bereiche auftreten, können einige dieser Strukturen in S, S' und 19 festgestellt werden, wobei sich diese vorwiegend im N-terminalen Ende befinden (Abb. 31).

Obwohl die β -Struktur des Schwanzfaserproteins sehr unregelmäßig ist und daher nur unvollkommen mit der klassischen Struktur des Crysopa silk-Fibroins (Geddes et al., 1968) oder des Federkeratins (Fraser, zit. von Oliver, 1981) übereinstimmt, fällt die Häufigkeit von Gly und Ala in allen bisher erwähnten Proteinen auf.

Obwohl keine Homologie zwischen den Genen S, S' und 19 einerseits zu dem Gen 37 andererseits festgestellt werden konnte, bestehen doch große Ähnlichkeiten in der Aminosäurezusammensetzung (Tabelle 18).

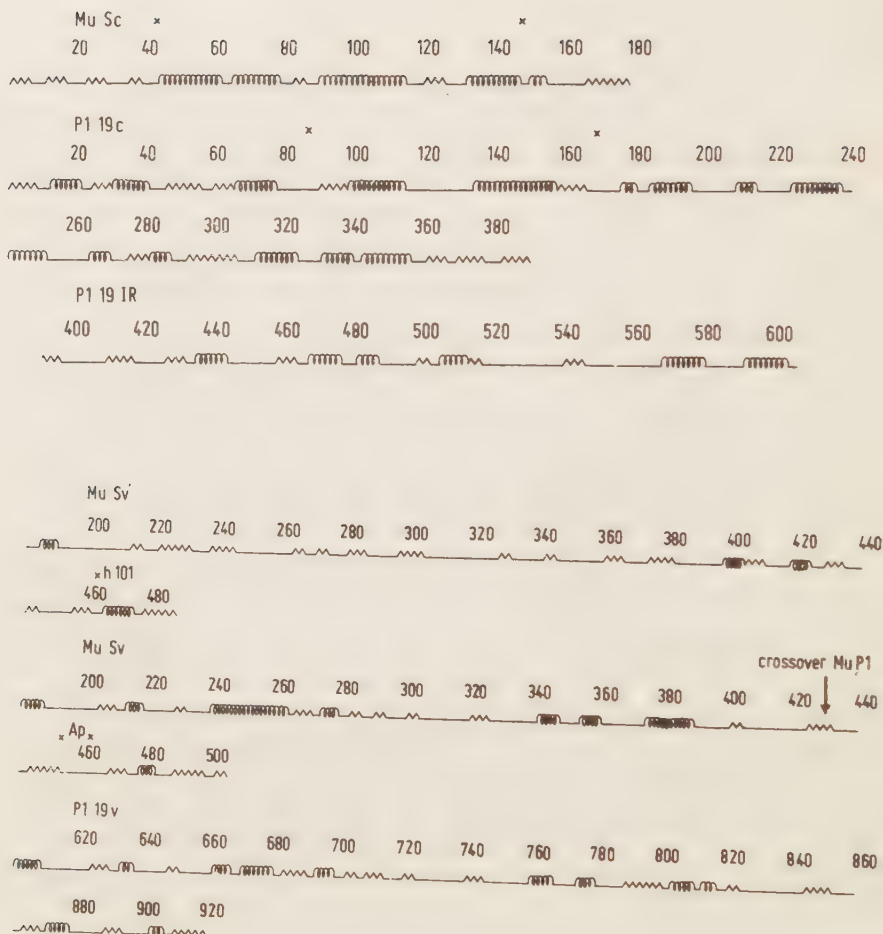


Abb. 31 Die hypothetische Sekundärstruktur der Schwanzfaserproteine bestimmt nach Chou-Fasman Regeln (1978)

Die Beta-Struktur ist mit Zacken, alpha-Helix mit Spulen und beta-Turn mit Linie gezeichnet. Die Sternchen deuten die homologe Region in Mu Sc und P1 19c an (A). Die Punktmutationen sind in S bzw. in S' angekreuzt. Der Pfeil zeigt die crossover-Stelle des P1-G-Segments in dem Phagen Mu (B).

Die β -Struktur ist jedoch sehr unregelmäßig: ihre Länge schwankt zwischen 5 und 12 Resten. Ähnliches findet man beim Protein 37 des Phagen T4 (7-15 Reste), das im übrigen ebenfalls eine erhöhte Hydrophobizität ausweist (Earnshaw, 1979; Oliver & Crowther, 1981). Während im Protein 37 jedoch keine α -helikalen Bereichen auftreten, können einige dieser Strukturen in S, S' und 19 festgestellt werden, wobei sich diese vorwiegend im N-terminalen Ende befinden (Abb. 31).

Obwohl die β -Struktur des Schwanzfaserproteins sehr unregelmäßig ist und daher nur unvollkommen mit der klassischen Struktur des *Crysopa* silk-Fibroins (Geddes et al., 1968) oder des Federkeratins (Fraser, zit. von Oliver, 1981) übereinstimmt, fällt die Häufigkeit von Gly und Ala in allen bisher erwähnten Proteinen auf.

Obwohl keine Homologie zwischen den Genen S, S' und 19 einerseits zu dem Gen 37 andererseits festgestellt werden konnte, bestehen doch große Ähnlichkeiten in der Aminosäurezusammensetzung (Tabelle 18).

Tabelle 18
Aminosäurezusammensetzung

	37 ^a	19v	Sv	Sv'	Fibroin ^b
Lys	3,8	4,0	4,3	2,2	
His	2,3	0,6	0,9	0,9	
Arg	4,9	6,2	5,5	4,8	
Asp/Asn	12,9	19,1	20,2	12,8	
Thr	8,7	6,5	6,1	9,3	
Ser	9,0	5,5	7,0	7,4	11
Glu/Gln	6,5	6,5	4,9	5,8	
Pro	2,7	0,9	0,9	2,9	
Gly	13,2	11,4	11,3	13,5	23
Ala	8,0	7,4	7,0	9,3	33
Cys	0,2	0,3	0,3	2,2	
Val	5,6	4,6	4,6	5,1	
Met	1,6	2,8	3,4	1,0	
Ile	6,8	7,1	5,8	6,1	
Leu	4,7	6,5	6,1	3,2	
Tyr	3,7	4,3	4,0	3,8	13
Phe	4,3	4,0	4,0	2,2	
Trp	1,0	2,8	3,1	3,2	

a - Oliver & Crowther, 1981

b - Geddes et al., 1968

Die Chou-Fasman Daten können auch für die Längenbestimmung eines Proteins benutzt werden, wie sie für das distale Schwanzfaserprotein von T4 (Earnshaw, 1979) und das Fibroin (Geddes et al., 1968) durchgeführt wurde. Das Molekulargewicht oder die Zahl der Aminosäuren des Proteins müssen dazu bekannt sein und die β -Struktur muß als regelmäßig betrachtet werden. Wenn man X Aminosäurereste ($X = 7$ für S und $X = 6$ für 19) für eine β -Windung und 4,7 Å als " β -spacing" nimmt, ergibt sich für die Länge des S bzw. des 19 Proteins:

Für S: 504 As : 7 = 72 Turns

$$72 \times 4,7 \text{ Å} = \underline{338,4 \text{ Å}}$$

Für 19: 928 As : 6 = 155 Turns

$$155 \times 4,7 \text{ Å} = \underline{728 \text{ Å}}$$

Diese Werte stimmen mit den elektronmikroskopischen Messungen von P1 (Walker & Walker, 1983) und von Mu gut überein. Nach diesen Daten sollten das S oder 19 Protein die ganze Schwanzfaser bzw deren distalen Teil der entsprechenden Phagen bilden (Abb. 29).

5.2.1.4 Die LPS-Bindungsstelle

Es wurde festgestellt, daß bei Mu bzw. P1 der C-terminale Teil des S- bzw. 19-Gens für die LPS Bindungsstelle kodiert. Bei allen bisher bekannten Phagen ist das C-terminale Ende des Schwanzfasergens ebenfalls an Wechselwirkungen mit den Zellwandstrukturen beteiligt (Newbold & Sinsheimer, 1970; Lindberg, 1977; Earnshaw, 1979; Revel, 1981; Goldenberg et

al., 1983; Tsui & Hendrix, 1983; Riede et al., 1984).

Wenn man die Primärstruktur des Sv bzw. 19v Proteinabschnitts (die letzten 80 Aminosäuren) betrachtet, findet man eine überdurchschnittliche Anzahl von basischen Aminosäuren (z.B. Arginin-Reste, die oft von Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten begleitet werden).

Die His- oder Arg-Reste könnten bei der Erkennung der Rezeptorstruktur eine Rolle spielen, obwohl nicht sie, sondern benachbarte Aminosäuren von verschiedenen Mutationen betroffen sind (siehe Mu G(-)h101 und Mu pAp1). Die Aminosäurenaustausche bei den oben genannten Punktmutationen ändern entweder die Ladung des betroffenen Proteinbereiches (Glu wurde in Mu G(-)h101 durch Lys ersetzt) oder sie erzeugen Konformationsänderungen wie im Falle des Mu pAp1 Phagen bei dem Asp bzw. Ser durch Gly bzw. Pro ersetzt wurden. Es ist bekannt, daß Gly häufig in β -Faltblattstrukturen auftaucht und Pro Strukturabbrüche erzeugt. Durch diese Änderungen verlieren bestimmte Bereiche ihre Aktivität und andere bekommen eine günstigere Lage zu der Rezeptorstruktur.

Da auch P1 bzw. das MuhP1-Hybrid eine 1-3 glycosidisch - gebundene Glucose erkennen, könnte man eine gewisse Homologie in den C-terminalen Enden der Schwanzfaserproteine von T4 und P1 erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Aber im Protein 37 des T4 Phagen wurden innerhalb der letzten 140 Resten - wie bei P1 und Mu - auch basische Aminosäuren gefunden, die als getrennte Wiederholungseinheiten aus His - x - His (x = Ser, Gly, Thr) liegen (Oliver & Crowther,

1981). Durch Faltung der Polypeptidkette könnten diese Einheiten zusammenkommen und die LPS- Bindungsstelle bzw. die funktionelle Domäne des Proteins 37 ausbilden, die die terminale Glucose des *E.coli* B-LPSs erkennt (Prehm et al., 1976).

Gewisse Homologien zwischen den Rezeptor-Bindungssequenzen wurden auch bei anderen Proteinen bemerkt, die ähnliche Strukturen erkennen. Ein Beispiel dafür ist die Homologie im Erkennungsbereich für Zucker bei Lac- und Gal-Repressoren und einigen periplasmatischen Zuckerbindungsproteinen (Müller-Hill, 1983).

5.2.1.5 Evolution der Schwanzfasern bei den Phagen Mu, P1, P7 und D108

Charakteristisch für Mu, P1, P7 und D108 ist die Anwesenheit des invertierbaren G-Segments (Chow et al., 1978; Hull et al., 1978). Mu und D108 haben ähnliche Eigenschaften und zeigen in elektronmikroskopischen Aufnahmen weitgehend homologe Genome. Daß das G-Segment auch in Phagen P1 und P7 auftaucht, die mit Mu nicht verwandt sind, spricht für seine ursprüngliche Rolle als Transposon. Während der Evolution wurde diese Eigenschaft durch die Fähigkeit ersetzt, Gene des G-Segments an- und abzuschalten. Dies wurde durch die benachbarte *gin*-Funktion ermöglicht.

In der Mitte des G-Segments befindet sich ein Terminator, bezüglich dessen die Gene U, U' sowie Sv und Sv' in symmetrischer Weise eingeordnet sind. Diese Symetrie und die partielle Homologie zwischen den beiden Hälften lassen

vermuten, daß das G-Segment durch eine Duplikation entstand und dann während der Evolution stark mutiert wurde. Die meisten Basenaustausche sind neutrale Mutationen, die keine signifikanten Änderungen der Proteinkonformation bringen; dagegen können vermutlich einige Mutationen die Faltung des Proteins beeinflussen und/oder neue aktive Stellen erzeugen, wodurch andere Rezeptorstukturen erkannt werden.

Wie auch das Beispiel der Wirtsbereichsmutanten von Mu zeigt, genügen bereits Punktmutationen um wesentliche Veränderungen der aktiven Stellen zu bewirken. Weiterhin kann man unterscheiden zwischen Mutationen, die irgendwann in der Evolution der Schwanzfasern aufgetreten sind und zur Stabilisierung ihrer Struktur geführt haben und Mutationen die im Kontakt mit neuen Wirten erzeugt wurden und deren Stabilität von der G-Inversion bestimmt wurde. Da die G-Segmente von P1, P7 und D108 dem von Mu strukturell ähnlich sind, läßt sich vermuten, daß hier eine ähnliche Evolution vorliegt.

Trotz der im allgemeinen geringen Ähnlichkeit der konstanten Teile von S und 19, gibt es einen kurzen Strang in ungefähr dem gleichen Abstand vom N-terminalen Ende der Schwanzfasergene, der eine signifikante Homologie aufweist (Kamp et al., 1984). Dies legt nahe, daß der konstante Teil von S dem ersten Teil des konstanten Teils von 19 entspricht. Der in 19 verbleibende Teil bis zum IR hat ungefähr die gleiche Länge, so daß man vermuten kann, daß der konstante Teil der P1-Schwanzfaser durch eine Duplikation desjenigen Teils entstanden ist, der Mu und P1

gemeinsam zu sein scheint.

Die langen IRs von P1 enthalten an den beiden Enden die symmetrischen Hälften der "inverted repeats" von Mu: sie könnten während der Evolution durch eine Insertion in die IRs von Mu erzeugt worden sein. Umgekehrt könnten aber auch die IRs von Mu durch eine Deletion aus den IRs von P1 entstanden sein. So weist auch P7 im Vergleich mit P1 eine Deletion in einem seiner IRs auf.

Der Vergleich der Schwanzfasergene von Mu, P1 und P7 legt nahe, daß ihre Evolution in Schritten stattgefunden hat, wobei kleine Stücke von Genen zwischen den Phagen ausgetauscht und dann als Folge der sequenzspezifischen Rekombination zusammengesetzt wurden. In dieser Hinsicht gleicht das Schwanzfasergen einem sogenannten "gen in pieces" (Symonds, 1982). Ein Beispiel von "gen in pieces" bei Eukaryonten ist das Immunglobulingen (Tonegawa, 1983).

5.3 Andere Beispiele von DNA-Umordnungen

Spezifische DNA-Anordnungen bestimmen nicht nur die veränderlichen Wirtsbereiche von Mu und anderen Phagen, sondern auch die abwechselnde Expression der Flagellaantigene bei *Salmonella typhimurium* (Zieg et al., 1978) oder der Pilusantigene bei *Neisseria gonorrhoeae* (Meyer et al., 1982). Sie sind auch an der Gen-Regulation und der genetischen Diversität bei Eukaryonten beteiligt.

Solche DNA-Umordnungen können z.B. unterschiedliche Antikörper-Spezifitäten erzeugen. Die variablen und konstanten Regionen in Immunglobulinen werden von verschiedenen Gen-

Segmenten kodiert und während der Differenzierung der Keimzelle bzw. Stammzelle durch intrachromosomale Rekombination in verschiedenen Kombinationen zusammengebracht, wobei die Gen-Fusion an die "joining"-Sequenzen stattfindet (Tonegawa, 1983; Shimizu & Honjo, 1984).

Ein anderer Typ der DNA-Umordnung ist die Antigenvariation bei *Trypanosomen* (Borst & Cross, 1982). Die verschiedenen Gene, die für die riesige Menge der "variant surface" Glycoproteine (VSG) kodieren, sind alle im Trypanosom-Genrepertoire vorhanden. Die Aktivierung der VSG-Gene findet durch duplikative Transposition einer "silent copy" zu einer Expressionsstelle statt.

Da die beweglichen Elemente nicht nur die Expression oder Struktur einzelner Gene, sondern selbst den Aufbau des gesamten Genoms verändern können, dürften sie bei den langfristigen genetischen Veränderungen, die der Evolution zugrunde liegen, eine wichtige Rolle spielen.

6. LITERATUR

Adams, M.H. (1959) Antigenic properties. In: Bacteriophages. Inc. Publishers, pp. 97-119. New York.

Amati, P. (1962) Abortive infection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* with coliphage P1. J. Bacteriol. 83, 433-434.

Appleyard, R.K. (1954) Segregation of Lambda lysogenicity during bacterial recombination in *E.coli* K12. Genet. 39, 429-439.

B{chi, B. & Arber, W.. (1977) Physical mapping of Bgl II, Bam HI, EcoRI, Hind III and Pst I restriction fragments of bacteriophage P1 DNA. Mol. Gen. Genet. 153, 311-324.

Borst, P. & Cross, G. A. M.. (1982) Molecular basis for trypanosome antigenic variation. Cell 29, 291-303.

Bradley, D.E. (1970) A comparative study of some properties of the ϕ X174 type bacteriophages. Can. J. Microbiol. 16, 965-971.

Buchwald, M. & Siminovitch, L. (1969) Production of serum-blocking material by mutants of the left arm of the λ chromosome. Virology, 38, 1-7.

Bukhari, A.I. (1976) Bacteriophage Mu as a transposition element. Ann. Rev. Genet. 10, 389-412.

Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1978) Empirical predictions of protein conformation. Ann. Rev. Biochem. 47, 251-76.

Chow, L.T. & Bukhari, A.I. (1976) The invertible DNA segments of coliphages Mu and P1 are identical. Virology 74, 242-248.

Chow, L.T., Kahmann, R. & Kamp, D. (1977) Electronmicroscopic characterization of DNAs of non-defective deletion mutants of bacteriophage Mu. J. Mol. Biol. 113, 591-609.

Chow, T.L., Broker, T.R., Kahmann, R. & Kamp, D. (1978) Comparison of the G DNA inversion in bacteriophages Mu, P1 and P7. In: Microbiology (Schlessinger, D. ed.) pp. 55-56. ASM, Washington D.C.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114.

Craigie, R. Mizuuchi, M. & Mizuuchi, K. (1984) Site specific recognition of the bacteriophage Mu ends by the Mu A protein. Cell 39, 387-394.

Daniell, E., Abelson, J., Kim, J.S. & Davidson, N. (1973) Heteroduplex structures of bacteriophage Mu DNA. *Virology* 51, 237-239.

Dawes, J. (1975) Characterization of the bacteriophage T4 receptor site. *Nature*, 256, 127-128.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acids sequence database. *DNA* 1, 51-56.

Dayhoff, M.O., Barker, W.C. & Hunt, L.T. (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed.) 91, 524-529. Acad. Press, N. Y.

Earnshaw, W.C., Goldberg, E.B. & Crowther, R.A. (1979) The distal half of the tail fibre of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 132, 101-131.

Endow, S.A. & Roberts, R.J. (1977) Two restriction -like Enzymes from *Xanthomonas malvacearum* *J. Mol. Biol.*, 112, 521-529.

Faellen, M., Toussaint, A., Lefebvre, N., Mergeay, M., Thiry, G. & Braibson-Thiry, J. (1981) Certaines souches de *Ervinia* sont sensibles au bacteriophage Mu. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochemie* 89B, 55-56.

Feige, U. & Stirm, S. (1976) On the structure of the *E.coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its ϕ X174 receptor region. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 71, 566-573.

Galanos, C., Luderitz, O. & Westphal, O. (1969) A new method for the extraction of R-lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 2, 245-249.

Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E.T. & Westphal, O. (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component. In: *Biochemistry of Lipids* (Goodwin, T. W. ed.) pp. 239-335. University Press, Baltimore.

Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D.T. & Beighton, E. (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343-358.

Gill, G.S., Hull, R.C. & Curtiss III, R. (1981) Mutator bacteriophage D108 and its DNA; an electron microscopic characterization. *J. Virol.*, 37, 320-430.

Giphart-Gassler, M., Plasterk, R. & van de Putte, P. (1982) G inversion in bacteriophage Mu: a novel way of gene splicing. *Nature*, 297, 339-342.

Goldberg, R.B., Bender, R.A. & Streicher, S.L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J Bacteriology* 118, 810-814.

Goldenberg, D.P., Smith, D.H. & King, J. (1983) Genetic analysis of the folding pathway for the tail spike protein of phage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7060-7064.

Grundy, F.J. & Howe, M.M. (1984) Involvement of the invertible G Segment in bacteriophage Mu tail fiber biosynthesis. *Virology* 134, 296-317.

Hartmann, H. & Goebel, W. (1977) A new restriction enzyme from *Enterobacter cloacae* (Ec/I). *FEBS Lett.* 80, 285-287.

Heffron, F. (1983) Tn3 and its relatives. In: Mobile genetic elements. (Shapiro, J. A. ed.) pp. 223-258. Acad. Press, N. Y.

Heller, K. & Braun, V. (1979) Accelerated adsorption bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J. Bacteriology* 139, 32-30.

Henning, U. & Jann, K. (1979) Two components nature of bacteriophage T4 receptor activity in *E.coli* K12. *J. Bacteriology* 137, 664-666.

Hermann, R. & Wood, W.B. (1981) Assembly of bacteriophage T4 tail fibers: identification and characterization of the non structural protein gp 57. *Mol. Gen. Genet.* 184, 125-132.

Hiestand-Nauer, R. & Iida, S. (1983) Sequences of the site-specific recombinase gene *cin* and of its substrates serving in the inversion of the C segment of bacteriophage P1. *EMBO J.* 2, 1733-1740.

Hoffman, J., Lindberg, B. & Svensson, S. (1972) Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* 26, 661-666.

Holme, T., Lindberg, A.A., Garegg, P.J. & Onn, T. (1968) Chemical composition of cell wall polysaccharide of rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 52, 45-54.

Howe, M.M. & Bade, E.G. (1975) Molecular Biology of Bacteriophage Mu. *Science* 190, 624-632.

Howe, M.M., Schumm, J.W. & Taylor, A.L. (1979) The S and U genes of bacteriophage Mu are located in the invertible G segment of Mu DNA. *Virology* 92, 108-124.

Howe, M.M. (1980) The invertible G segment of phage Mu.

Daniell, E., Abelson, J., Kim, J.S. & Davidson, N. (1973) Heteroduplex structures of bacteriophage Mu DNA. *Virology* 51, 237-239.

Dawes, J. (1975) Characterization of the bacteriophage T4 receptor site. *Nature*, 256, 127-128.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acids sequence database. *DNA* 1, 51-56.

Dayhoff, M.O., Barker, W.C. & Hunt, L.T. (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed.) 91, 524-529. Acad. Press, N. Y.

Earnshaw, W.C., Goldberg, E.B. & Crowther, R.A. (1979) The distal half of the tail fibre of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 132, 101-131.

Endow, S.A. & Roberts, R.J. (1977) Two restriction -like Enzymes from *Xanthomonas malvacearum* *J. Mol. Biol.*, 112, 521-529.

Faelen, M., Toussaint, A., Lefebvre, N., Mergeay, M., Thiry, G. & Braibson-Thiry, J. (1981) Certaines souches de *Ervinia* sont sensibles au bacteriophage Mu. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 89B, 55-56.

Feige, U. & Stirm, S. (1976) On the structure of the *E.coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its ϕ X174 receptor region. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 71, 566-573.

Galanos, C., Luderitz, O. & Westphal, O. (1969) A new method for the extraction of R-lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9, 245-249.

Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E.T. & Westphal, O. (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component. In: *Biochemistry of Lipids* (Goodwin, T. W. ed.) pp. 239-335. University Press, Baltimore.

Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D.T. & Beighton, E. (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343-358.

Gill, G.S., Hull, R.C. & Curtiss III, R. (1981) Mutator bacteriophage D108 and its DNA: an electron microscopic characterization. *J. Virol.*, 37, 320-430.

Giphart-Gassler, M., Plasterk, R. & van de Putte, P. (1982) G inversion in bacteriophage Mu: a novel way of gene splicing. *Nature*, 297, 339-342.

Goldberg, R.B., Bender, R.A. & Streicher, S.L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J Bacteriology* 118, 810-814.

Goldenberg, D.P., Smith, D.H. & King, J. (1983) Genetic analysis of the folding pathway for the tail spike protein of phage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7060-7064.

Grundy, F.J. & Howe, M.M. (1984) Involvement of the invertible G Segment in bacteriophage Mu tail fiber biosynthesis. *Virology* 134, 296-317.

Hartmann, H. & Goebel, W. (1977) A new restriction enzyme from *Enterobacter cloacae* (Ec/I). *FEBS Lett.* 80, 285-287.

Heffron, F. (1983) Tn3 and its relatives. In: Mobile genetic elements. (Shapiro, J. A. ed.) pp. 223-258. Acad. Press. N. Y.

Heller, K. & Braun, V. (1979) Accelerated adsorption bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J. Bacteriology* 139, 32-30.

Henning, U. & Jann, K. (1979) Two components nature of bacteriophage T4 receptor activity in *E.coli* K12. *J. Bacteriology* 137, 664-666.

Hermann, R. & Wood, W.B. (1981) Assembly of bacteriophage T4 tail fibers: identification and characterization of the non structural protein gp 57. *Mol. Gen. Genet.* 184, 125-132.

Hiestand-Nauer, R. & Iida, S. (1983) Sequences of the site-specific recombinase gene *cin* and of its substrates serving in the inversion of the C segment of bacteriophage P1. *EMBO J.* 2, 1733-1740.

Hoffman, J., Lindberg, B. & Svensson, S. (1972) Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* 26, 661-666.

Holme, T., Lindberg, A.A., Garegg, P.J. & Onn T. (1968) Chemical composition of cell wall polysaccharide of rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 52, 45-54.

Howe, M.M. & Bade, E.G. (1975) Molecular Biology of Bacteriophage Mu. *Science* 190, 624-632.

Howe, M.M., Schumm, J.W. & Taylor, A.L. (1979) The S and U genes of bacteriophage Mu are located in the invertible G segment of Mu DNA. *Virology* 92, 108-124.

Howe, M.M. (1980) The invertible G segment of phage Mu.

Daniell, E., Abelson, J., Kim, J.S. & Davidson, N. (1973) Heteroduplex structures of bacteriophage Mu DNA. *Virology* 51, 237-239.

Dawes, J. (1975) Characterization of the bacteriophage T4 receptor site. *Nature*, 256, 127-128.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acids sequence database. *DNA* 1, 51-56.

Dayhoff, M.O., Barker, W.C. & Hunt, L.T. (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed.) 91, 524-529. Acad. Press, N. Y.

Earnshaw, W.C., Goldberg, E.B. & Crowther, R.A. (1979) The distal half of the tail fibre of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 132, 101-131.

Endow, S.A. & Roberts, R.J. (1977) Two restriction -like Enzymes from *Xanthomonas malvacearum* *J. Mol. Biol.*, 112, 521-529.

Faelen, M., Toussaint, A., Lefebvre, N., Mergeay, M., Thiry, G. & Braibson-Thiry, J. (1981) Certaines souches de *Erwinia* sont sensibles au bacteriophage Mu. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 89B, 55-56.

Feige, U. & Stirn, S. (1976) On the structure of the *E.coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its ϕ X174 receptor region. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 71, 566-573.

Galanos, C., Luderitz, O. & Westphal, O. (1969) A new method for the extraction of R-lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9, 245-249.

Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E.T. & Westphal, O. (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component. In: *Biochemistry of Lipids* (Goodwin, T. W. ed.) pp. 239-335. University Press, Baltimore.

Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D.T. & Beighton, E. (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343-358.

Gill, G.S., Hull, R.C. & Curtiss III, R. (1981) Mutator bacteriophage D108 and its DNA; an electron microscopic characterization. *J. Virol.*, 37, 320-430.

Giphart-Gassler, M., Plasterk, R. & van de Putte, P. (1982) G inversion in bacteriophage Mu: a novel way of gene splicing. *Nature*, 297, 339-342.

Goldberg, R.B., Bender, R.A. & Streicher, S.L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J Bacteriology* 118, 810-814.

Goldenberg, D.P., Smith, D.H. & King, J. (1983) Genetic analysis of the folding pathway for the tail spike protein of phage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7060-7064.

Grundy, F.J. & Howe, M.M. (1984) Involvement of the invertible G Segment in bacteriophage Mu tail fiber biosynthesis. *Virology* 134, 296-317.

Hartmann, H. & Goebel, W. (1977) A new restriction enzyme from *Enterobacter cloacae* (Ec/I). *FEBS Lett.* 80, 285-287.

Heffron, F. (1983) Tn3 and its relatives. In: Mobile genetic elements. (Shapiro, J. A. ed.) pp. 223-258. Acad. Press. N. Y.

Heller, K. & Braun, V. (1979) Accelerated adsorption bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J. Bacteriology* 139, 32-30.

Henning, U. & Jann, K. (1979) Two components nature of bacteriophage T4 receptor activity in *E.coli* K12. *J. Bacteriology* 137, 664-666.

Hermann, R. & Wood, W.B. (1981) Assembly of bacteriophage T4 tail fibers: identification and characterization of the non structural protein gp 57. *Mol. Gen. Genet.* 184, 125-132.

Hiestand-Nauer, R. & Iida, S. (1983) Sequences of the site-specific recombinase gene *cin* and of its substrates serving in the inversion of the C segment of bacteriophage P1. *EMBO J.* 2, 1733-1740.

Hoffman, J., Lindberg, B. & Svensson, S. (1972) Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* 26, 661-666.

Holme, T., Lindberg, A.A., Garegg, P.J. & Onn, T. (1968) Chemical composition of cell wall polysaccharide of rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 52, 45-54.

Howe, M.M. & Bade, E.G. (1975) Molecular Biology of Bacteriophage Mu. *Science* 190, 624-632.

Howe, M.M., Schumm, J.W. & Taylor, A.L. (1979) The S and U genes of bacteriophage Mu are located in the invertible G segment of Mu DNA. *Virology* 92, 108-124.

Howe, M.M. (1980) The invertible G segment of phage Mu.

Daniell, E., Abelson, J., Kim, J.S. & Davidson, N. (1973) Heteroduplex structures of bacteriophage Mu DNA. *Virology* 51, 237-239.

Dawes, J. (1975) Characterization of the bacteriophage T4 receptor site. *Nature*, 256, 127-128.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acids sequence database. *DNA* 1, 51-56.

Dayhoff, M.O., Barker, W.C. & Hunt, L.T. (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed.) 91, 524-529. Acad. Press, N. Y.

Earnshaw, W.C., Goldberg, E.B. & Crowther, R.A. (1979) The distal half of the tail fibre of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 132, 101-131.

Endow, S.A. & Roberts, R.J. (1977) Two restriction -like Enzymes from *Xanthomonas malvacearum* *J. Mol. Biol.*, 112, 521-529.

Faelen, M., Toussaint, A., Lefebvre, N., Mergeay, M., Thiry, G. & Ebraison-Thiry, J. (1981) Certaines souches de *Erwinia* sont sensibles au bacteriophage Mu. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 89B, 55-56.

Feige, U. & Stirm, S. (1976) On the structure of the *E.coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its ϕ X174 receptor region. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 71, 566-573.

Galanos, C., Luderitz, O. & Westphal, O. (1969) A new method for the extraction of R-lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9, 245-249.

Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E.T. & Westphal, O. (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component. In: *Biochemistry of Lipids* (Goodwin, T. W. ed.) pp. 239-335. University Press, Baltimore.

Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D.T. & Beighton, E. (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343-358.

Gill, G.S., Hull, R.C. & Curtiss III, R. (1981) Mutator bacteriophage D108 and its DNA: an electron microscopic characterization. *J. Virol.*, 37, 320-430.

Giphart-Gassler, M., Plasterk, R. & van de Putte, P. (1982) G inversion in bacteriophage Mu: a novel way of gene splicing. *Nature*, 297, 339-342.

Goldberg, R.B., Bender, R.A. & Streicher, S.L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J Bacteriology* 118, 810-814.

Goldenberg, D.P., Smith, D.H. & King, J. (1983) Genetic analysis of the folding pathway for the tail spike protein of phage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7060-7064.

Grundy, F.J. & Howe, M.M. (1984) Involvement of the invertible G Segment in bacteriophage Mu tail fiber biosynthesis. *Virology* 134, 296-317.

Hartmann, H. & Goebel, W. (1977) A new restriction enzyme from *Enterobacter cloacae* (Ec/I). *FEBS Lett.* 80, 285-287.

Heffron, F. (1983) Tn3 and its relatives. In: Mobile genetic elements. (Shapiro, J. A. ed.) pp. 223-258. Acad. Press, N. Y.

Heller, K. & Braun, V. (1979) Accelerated adsorption bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J. Bacteriology* 139, 32-30.

Henning, U. & Jann, K. (1979) Two components nature of bacteriophage T4 receptor activity in *E.coli* K12. *J. Bacteriology* 137, 664-666.

Hermann, R. & Wood, W.B. (1981) Assembly of bacteriophage T4 tail fibers: identification and characterization of the non structural protein gp 57. *Mol. Gen. Genet.* 184, 125-132.

Hiestand-Nauer, R. & Iida, S. (1983) Sequences of the site-specific recombinase gene *cin* and of its substrates serving in the inversion of the C segment of bacteriophage P1. *EMBO J.* 2, 1733-1740.

Hoffman, J., Lindberg, B. & Svensson, S. (1972) Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* 26, 661-666.

Holme, T., Lindberg, A.A., Garegg, P.J. & Onn, T. (1968) Chemical composition of cell wall polysaccharide of rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 52, 45-54.

Howe, M.M. & Bade, E.G. (1975) Molecular Biology of Bacteriophage Mu. *Science* 190, 624-632.

Howe, M.M., Schumm, J.W. & Taylor, A.L. (1979) The S and U genes of bacteriophage Mu are located in the invertible G segment of Mu DNA. *Virology* 92, 108-124.

Howe, M.M. (1980) The invertible G segment of phage Mu.

Daniell, E., Abelson, J., Kim, J.S. & Davidson, N. (1973) Heteroduplex structures of bacteriophage Mu DNA. *Virology* 51, 237-239.

Dawes, J. (1975) Characterization of the bacteriophage T4 receptor site. *Nature*, 256, 127-128.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acids sequence database. *DNA* 1, 51-56.

Dayhoff, M.O., Barker, W.C. & Hunt, L.T. (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed.) 91, 524-529. Acad. Press, N. Y.

Earnshaw, W.C., Goldberg, E.B. & Crowther, R.A. (1979) The distal half of the tail fibre of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 132, 101-131.

Endow, S.A. & Roberts, R.J. (1977) Two restriction -like Enzymes from *Xanthomonas malvacearum* *J. Mol. Biol.*, 112, 521-529.

Faelen, M., Toussaint, A., Lefebvre, N., Mergeay, M., Thiry, G. & Braibson-Thiry, J. (1981) Certaines souches de *Erwinia* sont sensibles au bacteriophage Mu. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 89B, 55-56.

Feige, U. & Stirm, S. (1976) On the structure of the *E.coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its ϕ X174 receptor region. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 71, 566-573.

Galanos, C., Luderitz, O. & Westphal, O. (1969) A new method for the extraction of R-lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9, 245-249.

Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E.T. & Westphal, O. (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component. In: *Biochemistry of Lipids* (Goodwin, T. W. ed.) pp. 239-335. University Press, Baltimore.

Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D.T. & Beighton, E. (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343-358.

Gill, G.S., Hull, R.C. & Curtiss III, R. (1981) Mutator bacteriophage D108 and its DNA; an electron microscopic characterization. *J. Virol.*, 37, 320-430.

Giphart-Gassler, M., Plasterk, R. & van de Putte, P. (1982) G inversion in bacteriophage Mu: a novel way of gene splicing. *Nature*, 297, 339-342.

Goldberg, R.B., Bender, R.A. & Streicher, S.L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. *J Bacteriology* 118, 810-814.

Goldenberg, D.P., Smith, D.H. & King, J. (1983) Genetic analysis of the folding pathway for the tail spike protein of phage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7060-7064.

Grundy, F.J. & Howe, M.M. (1984) Involvement of the invertible G Segment in bacteriophage Mu tail fiber biosynthesis. *Virology* 134, 296-317.

Hartmann, H. & Goebel, W. (1977) A new restriction enzyme from *Enterobacter cloacae* (Ec/I). *FEBS Lett.* 80, 285-287.

Heffron, F. (1983) Tn3 and its relatives. In: Mobile genetic elements. (Shapiro, J. A. ed.) pp. 223-258. Acad. Press, N. Y.

Heller, K. & Braun, V. (1979) Accelerated adsorption bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J. Bacteriology* 132, 32-30.

Henning, U. & Jann, K. (1979) Two components nature of bacteriophage T4 receptor activity in *E.coli* K12. *J. Bacteriology* 137, 664-666.

Hermann, R. & Wood, W.B. (1981) Assembly of bacteriophage T4 tail fibers: identification and characterization of the non structural protein gp 57. *Mol. Gen. Genet.* 184, 125-132.

Hiestand-Nauer, R. & Iida, S. (1983) Sequences of the site-specific recombinase gene *cin* and of its substrates serving in the inversion of the C segment of bacteriophage P1. *EMBO J.* 2, 1733-1740.

Hoffman, J., Lindberg, B. & Svensson, S. (1972) Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* 26, 661-666.

Holme, T., Lindberg, A.A., Garegg, P.J. & Onn T. (1968) Chemical composition of cell wall polysaccharide of rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 52, 45-54.

Howe, M.M. & Bade, E.G. (1975) Molecular Biology of Bacteriophage Mu. *Science* 190, 624-632.

Howe, M.M., Schumm, J.W. & Taylor, A.L. (1979) The S and U genes of bacteriophage Mu are located in the invertible G segment of Mu DNA. *Virology* 92, 108-124.

Howe, M.M. (1980) The invertible G segment of phage Mu.

Cell 21, 605-606.

Hsu, M.T. & Davidson, N. (1974) Electron microscopy heteroduplex study of the heterogeneity of Mu phage and prophage DNA. *Virology* 58, 229-239.

Hull, R.A., Gill, G.S. & Curtis, R. (1978) Genetic characterization of Mu like bacteriophage D108. *Virology*, 27, 513-518.

Iida, S. (1984) Bacteriophage P1 carries two related sets of genes determining its host range in the invertible C segment of its genome. *Virology*, 134, 421-434.

Iida, S., Meyer, J., Kennedy, K.E. & Arber, W. (1982) A site-specific, conservative recombination system carried by bacteriophage P1. Mapping the recombinase gene *cix* and the cross-over *cix* for the inversion of the C segment. *EMBO J.* 1, 1445-1453.

Jansson, P., Lindberg, A.A., Lindberg, B. & Wollin, R. (1981) Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from *Enterobacteriaceae*. *Eur. J. Biochem.* 115, 571-577.

Jazwinski, S.M., Lindberg, A.A. & Kornberg, A. (1975) The lipopolysaccharide receptor for bacteriophages ϕ x174 and S13. *Virology*, 66, 268-282.

Kamp, D., Kahmann, R., Zipser, D., Broker, T.R. & Chow, L. (1978) Inversion of the G DNA segment of phage Mu controls phage infectivity. *Nature* 271, 577-580.

Kamp, D., Chow, L.T., Broker, T.R., Kwoh, D., Zipser, D. & Kahmann, R. (1979) Site-specific recombination in phage Mu. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 1159-1167.

Kamp, D. & Kahmann, R. (1981) The relationship of two invertible segments in bacteriophage Mu and *Salmonella typhimurium* DNA. *Mol. Gen. Genet.* 184, 564-566.

Kamp, D. (1981) Invertible deoxyribonucleic acid: the G segment of bacteriophage Mu. In: *Microbiology-1981* (Schlessinger, D. ed.) pp. 73-76. ASM, Washington D.C.

Kamp, D. & Kahmann, R. (1981) Two pathways in bacteriophage Mu transposition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 65, 329-336.

Kamp, D. & Sandulache, R. (1983) Recognition of cell surface receptors is controlled by invertible DNA of phage Mu. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 131-135.

Kamp, D., Kardas, E., Ritthaler, W., Sandulache, R., Schmucker, R. & Stern, B. (1984) Comparative analysis of invertible DNA in phage genomes. *Cold Spring Harbor Symp.*

Quant. Biol. 94 N.Y.

Kamp, D., Kahmann, R. & Stern, B. (1985) The *gin* gene of bacteriophage Mu. Embo J., im Druck.

Kardas, E. (1984) Identifizierung der Schwanzfasergene des Phagen P1. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität.

Kuner, J.M. & Kaiser, D. (1981) Introduction of transposon Tn5 into *Myxococcus* for analysis of developmental and other nonselectable mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 425-429.

Kutsukake, K. & Iino, T. (1980) Inversions of specific DNA segments in flagellar phase variation in *Salmonella* and inversion systems of bacteriophages P1 and Mu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7338-7341.

Leach, D. & Symonds, N. (1979) The isolation and characterization of a plaque forming derivative of bacteriophage Mu carrying a fragment of Tn3 conferring ampicillin resistance. Mol. Gen. Genet. 172, 179-184.

Lindberg, A.A. (1973) Bacteriophage receptors. Ann. Rev. Microbiol. 27, 205-241.

Lindberg, A.A. (1977) Bacterial surface carbohydrates and phage adsorption. In: Surface carbohydrates of the procaryotic cells (Sutherland, I. W. ed.) pp. 289-356. Acad. Press, N.Y. and London.

Lipkin, D., Phillips, B.E. & Abrell, J.W. (1969) The action of hydrogenfluoride on nucleotides and other esters of phosphorus (V) acids. J. Org. Chem. 34, 1539-1547.

Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. Methods in Enzymology (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed.) 65, 499-560.

McClintock, B. (1950) The origin and behaviour of mutable loci in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 36, 344-355.

McClintock, B. (1956) Controlling elements and the gene. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21, 197-216.

Meyer, T.F., Mlawer, N. & So, M. (1982) Pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae* involves chromosomal rearrangement. Cell 30, 45-52.

Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Mizuuchi, K. (1983) In vitro transposition of bacteriophage Mu, a biochemical approach to a novel replication reaction. Cell 35, 785-794.

Murooka, Y. & Harada, T. (1979) Expansion of the host range of coliphage P1 and gene transfer from enteric bacteria to other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 754-757.

Müller-Hill, B. (1983) Sequence homology between Lac and Gal repressors and three sugar-binding periplasmic proteins. *Nature* 302, 163-164.

Nash, H.A. (1981) Integration and excision of bacteriophage Lambda: The mechanism of conservative site-specific recombination. *Ann. Rev. Genet.* 15, 143-167.

Newbold, J.E. & Sinsheimer, R.L. (1970) Process of infection with bacteriophage ϕ x174. *Journal of Virology* 5, 427-431.

Oliver, D.B., Crowther, R.A. (1981) DNA Sequence of the Tail Fibre Genes 36 and 37 of Bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 153, 545-568.

Ornellas, E.P. & Stocker, B.A.D. (1974) Relation of lipopolysaccharide character to P1 sensitivity in *Salmonella typhimurium*. *Virology* 60, 491-502.

Osborn, M.J. (1968) Biochemical characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* lacking glycosyl or galactosyl lipopolysaccharide transferases. *Nature* 217, 957-960.

Osborn, M. & Rothfield, L.I. (1971) Biosynthesis of the core region of LPS. In: *Microbial Toxins*. (Weinbaum, G., Kadis S. & Ajl, S. J. ed.) pp. 331-350. Acad. Press, New York.

Plasterk, R.H.A., Brinkman, A. & van de Putte, P. (1983) DNA inversions in the chromosome of *Escherichia coli* and in bacteriophage Mu: Relationship to other site-specific recombination systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5355-5358.

Plasterk, R.H.A. & van de Putte, P. (1984) Genetic switches by DNA inversions in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta* 782, 111-119.

Prehm, P., Stirm, S., Jann, B. & Jann, K. (1975) Cell wall LPS from *E. coli* B. *Eur. J. Biochem.*, 56, 41-55.

Prehm, P., Jann, B., Jann, K., Schmidt, G. & Stirm, S. (1976) On a bacteriophage T3 and T4 receptor region within the cell wall LPS of *E. coli* B. *J. Mol. Biol.*, 101, 277-281.

Prehm, P., Schmidt, G., Jann, B. & Jann, K. (1976) The cell wall LPS of *E. coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, 70, 171-177.

Rapin, A.M.C. & Kalker, H.M. (1971) The relation of

bacteriophage attachment to lipopolysaccharide structure. In: Microbial Toxins (Weinbaum, G., Kadis, S. & Ajl, S. ed.) 4. pp. 267-307. Acad. Press, N.Y.

Revel, H.R. (1981) Molecular cloning of the T4 genome, organization and expression of the tail fiber gene cluster 34-38. Mol. Gen. Genet. 182, 445-455.

Riede, I., Eschbach, M-L. & Henning, U. (1984) DNA sequence heterogeneity in the genes of T-even type *Escherichia coli* phages encoding the receptor recognizing protein of the long tail fibers. Mol. Gen. Genet. 195, 144-152.

Rosner, J.L. (1972) Formation, induction, and curing of bacteriophage P1 lysogens. Virology 49, 679-689.

Saedler, H. & Starlinger, P. (1967) O⁰ Mutation in the galactose operon in *E.coli*. Molec. Gen. Genet. 100, 178-189.

Sandulache, R., Prehm, P. & Kamp, D. (1984) Cell wall receptor for bacteriophage Mu G(+) J. of Bacteriology 160, 299-303.

Sandulache, R. & Prehm, P. (1985) Structure of the core oligosaccharide from lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora*. J. of Bacteriology 161, 000-000.

Singer, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. & Petersen, G.P. (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. J. Mol. Biol. 162, 729-733.

Schumann, W. and Bade, E.G. (1979) In vitro constructed plasmids containing both ends of bacteriophage Mu DNA express phage functions. Mol. Gen. Genet. 169, 97-105.

Schumm, J.W. & Howe, M.M. (1980). Analysis of integration and excision of bacteriophage Mu: a new approach in "Microbiology- 1980" (Schlessinger D. ed.) pp. 237-240. ASM, Washington, D.C.

Schwartz, M. (1980) Interaction of phages with their receptor proteins. In: Virus receptors (Randall, L. L. & Philipson, L. ed.) pp. 59-94. Chapman and Hall, London and New York.

Schwartz, M. (1975) Reversible interaction between coliphage lambda and its receptor protein. J. Mol. Biol. 99, 185-201.

Schwarz, H., Ride, I., Sonntag, I. & Henning, U. (1983) Degrees of relatedness of T-even type *E.coli* phages using different or the same receptors and topology of serologically cross-reacting sites. EMBO J., 2, 375-380.

Sengstag, C. & Arber, W. (1983) The sequence of the

bacteriophage P1 genome region serving as hot target for IS2 insertion. *Embo J.* 10, 1777-1781.

Shimizu, A. & Honjo, T. (1984) Immunoglobulin class switching. *Cell*, 36, 801-803.

Silverman, M. & Simon, M. (1983) Phase variation and related systems. In: *Mobile genetic elements* (Shapiro, J.A. ed.) pp. 537-557. Acad. Press, N. Y.

Simon, M., Zieg, J., Silverman, M., Mandel, G. & Doolittle, R. (1980) Genes whose mission is to jump. *Science*, 209, 1370-1374.

Spiro, R.G. (1966) Analysis of sugars found in glycoproteins. In: *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed.) 2, pp. 44-49. Acad. Press. NY and London

Stellner, K., Saito, H. & Hakomori, S.I. (1973) Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 464-472.

Strominger, J.L., Park, J.T. & Thompson, R.E. (1959) Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus*; Its relation to the mechanism of action of penicillin. *J. Biol. Chem.* 234, 3263-3269.

Starlinger, P. (1984) Transposable elements. *TIBS*, April, 125-127.

Stougaard, P. & Molin, S. (1981) Vertical dye-buoyant density gradients for rapid analysis and preparation of plasmid DNA. *Anal. Biochem.* 118, 191-193.

Sukupolvi, S. (1984) Role of lipopolysaccharide in the receptor function for bacteriophage O_{x2}. *FEMS Microbiol. Lett.* 21, 83-87.

Sutcliffe, J.G. (1978) pBR322 restriction map derived from the DNA sequence. *Nucl. Ac. Res.* 8, 2721-2728.

Symonds, N. (1982) A novel gene splice in phage Mu. *Nature*, 297, 288-289.

Taylor, A.L. (1963) Bacteriophage induced mutation in *E.coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 1043-1051.

Tomas, J.M. & Kay, W.W. (1984) Effect of bacteriophage P1 lysogeny on lipopolysaccharide composition and the Lambda receptor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriology*, 159, 1047-1052.

Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302, 575-581.

Toussaint, A. & Faellen, M. (1973) Connecting two

unrelated DNA sequences with a Mu dimer. *Nature New Biol.* 241, 1-4.

Toussaint, A., Lefebvre, N., Scott, J.R., Cowan, J.A., Bruijn, F. & Bukhari, A.I. (1978) Relationship between temperate phages Mu and P1. *Virology*, 89, 146-161.

Toussaint, A. & Resibois, A. (1982) Phage Mu: transposition as a life style. In: *Mobile genetic elements* (Shapiro, J. A. ed.) pp. 105-158. Acad. Press, N.Y.

Tsai, C.M. & Frasch, C.E. (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119, 115-119.

Tsui, L.-C. & Hendrix, R. (1983) Proteolytic processing of phage lambda tail protein gpH: Timing of the cleavage. *Virology* 125, 257-264.

Van de Putte, P., Cramer, S. & Giphart-Gassler, M. (1980) Invertible DNA determines host specificity of bacteriophage Mu. *Nature (London)*, 286, 218-222.

Walker, J.T., & Walker, D.H. Jr. (1983) Coliphage P1 morphogenesis: analysis of mutants by electronmicroscopy. *J. Virology*, 45, 1118-1139.

Waravdekar, V.S. & Saslaw, L.D. (1959) A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-deoxy sugars with the use of the malonaldehyde - thiobarbituric acid reaction. *J. Biol. Chem.* 234, 1945-1950.

Westphal, O. & Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In : *Methods in carbohydrate research* (Whistler, R. L. & Wolfrom, M. L., ed.). Vol. 5, pp. 81-91. Acad. Press, New York

Wijffelman, C. and van de Putte, P. (1977) Asymmetric hybridization of Mu strands with short fragments synthesized during Mu DNA replication. In: *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes*, (Bukhari, A. I., Shapiro J. & Adhya, A. ed.) pp. 329-333. Cold Spring Harbor Press, N.Y.

Wilkinson, R.G. & Stocker, B.A.D. (1968) Genetics and cultural properties of mutants of *Salmonella typhimurium* lacking glucosyl or galactosyl LPS transferases. *Nature* 217, 955-957.

Wilson, J.H., Luftig, R.B. & Wood, W.B. (1970) Interaction of bacteriophage T4 tail fiber components with a lipopolysaccharide fraction from *Escherichia coli* *Mol. Biol.*, 51, 423-434.

Wood, W.B. & Bishop, R. J. (1973) Bacteriophage T4 tail fibers: structure and assembly of a viral organelle. In:

Virus research (Fox, C. F. & Robinson, W. S. ed.) pp. 303-324. Acad. Press, N. Y.

Wright, A., McConnell, M. & Kanegasaki, S. (1980) Lipopolysaccharide as a bacteriophage receptor. In: Virus receptors (Randall, L. L. & Philipson, L. ed.) pp. 29-57. Chapman and Hall, London and New York.

Yarmolinsky, M.B. (1977) Genetic and structure of bacteriophage P1 DNA. In: DNA insertion elements, plasmids and episomes. (Bukhari, A. I., Shapiro, J. & Adhya, A. ed.) pp. 721-732. Cold Spring Harbor Press, N.Y.

Yun, T. & Vapnek, D. (1977) Electron microscopic analysis of bacteriophages P1, P1Cm, and P7. Virology, 77, 376-381.

Zieg, J., Hilmen, M. & Simon, M. (1978) Regulation of gene expression by site-specific inversion. Cell. 15, 237-244.

7. Abkürzungen

LPS	Lipopolysaccharid
P.F.U.	plaque forming units
E.O.P.	efficiency of plating
IR	inverted repeat
SE	split ends
bp	Basenpaare

Lebenslauf

Name	Rodica Sandulache (geb. Stanescu)
Geburtstag	15.07.1941
Geburtsort	Medias (Rumänien)
Staatsangehörigkeit	staatenlos
Familienstand	verheiratet (ein Kind 14 Jahre)
Ausbildung	
1949 - 1953	Grundschule Ploiesti (Rumänien)
1953 - 1961	Gymnasium A.Toma, Ploiesti (Rumänien)
Juli 1961	Abitur
1961 - 1965	Universität Bukarest (Rumänien)
	Fakultät für Chemie
Juli 1965	Diplomarbeit
1965 - 1971	Forschungsinstitut für Getreide
	Bukarest (Rumänien)
	als Diplomchemikerin
1971 - 1979	Institut für Mikrobiologie
	"Dr. I. Cantacuzino" Bukarest
	als wissenschaftliche Hilfskraft
1975 - 1979	Doktorarbeit
	ohne Promotionsprüfung
seit 1980	Max-Planck-Institut für Biochemie
	München
1980 - 1981	MPI-Stipendiatin
1981 - 1983	MPI-Stipendiatin (Doktorarbeit)
1983 - 1984	BATII 1/2 (Doktorarbeit)

